

Metabolic Engineering von *Corynebacterium glutamicum* für die Produktion einer Dicarbonsäure

Andreas Otten

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institute of Bio- and Geosciences (IBG)
Biotechnology (IBG-1)

Metabolic Engineering von *Corynebacterium glutamicum* für die Produktion einer Dicarbonsäure

Andreas Otten

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 64

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-860-0

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über <<http://dnb.d-nb.de>> abrufbar.

Herausgeber und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich
Telefon (02461) 61-5368 · Telefax (02461) 61-6103
E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2013

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health Band / Volume 64

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2012)

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-860-0

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Ausschnitte der vorliegenden Dissertation werden in folgender Publikation erscheinen:

Otten, A., Bott, M. und Brocker, M. (2012) Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of itaconic acid

Inhaltsverzeichnis

I	Summary	1
II	Zusammenfassung	2
III	Einleitung	4
1	Petrochemie und die Zukunft von Bioraffinerien	4
2	Itaconsäure.....	5
2.1	Chemische Synthese	7
2.2	Biotechnologische Herstellung	8
2.3	Biosyntheseweg	9
3	<i>cis</i> -Aconitat-Decarboxylase (CAD).....	11
4	<i>Corynebacterium glutamicum</i> als Itaconat-Produzent	12
5	Ziele der Arbeit.....	13
IV	Material und Methoden	14
1	Puffer und Stammlösungen.....	14
2	Nährmedien.....	14
3	Oligonukleotide	15
4	Plasmide	18
5	Organismen	20
6	Stammhaltung von Bakterien.....	21
7	Kultivierung von Bakterienstämmen.....	22
7.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	22
7.2	Expressionskulturen.....	22
7.3	Kultivierung von <i>C. glutamicum</i>	22
8	Bestimmung von Wachstums- und Stoffwechselparametern	23
8.1	Bestimmung des Wachstums von Bakterien-Kulturen.....	23
8.2	Bestimmung des pH-Wertes	23
8.3	Bestimmung organischer Säuren und von Glucose im Kultivierungsüberstand mittels HPLC	24

Inhaltsverzeichnis

8.4	Qualitative und quantitative Itaconat-Bestimmung.....	24
8.5	Bestimmung intrazellulärer Metabolite mittels HPLC	25
8.6	Bestimmung organischer Säuren mittels GC-TOF-MS	26
9	Molekularbiologische Methoden	27
9.1	Herstellung und Transformation elektrokompenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen	27
9.2	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	27
9.3	Integration von Genen und Einführung chromosomaler Mutationen mit Hilfe des pK19 <i>mobsacB</i> -Systems	28
10	DNA-Techniken.....	30
10.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	30
10.2	Isolierung von genomischer DNA aus <i>C. glutamicum</i>	30
10.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
10.4	PCR-Purification-Kit.....	30
10.5	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	31
10.6	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	31
10.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
10.8	Kolonie-PCR.....	32
10.9	DNA-Sequenzanalyse	32
10.10	Restriktionsverdau	33
10.11	Ligation	33
10.12	Site-directed Mutagenese	33
10.13	Konstruktion von Plasmiden	33
11	Proteinbiochemische Methoden.....	35
11.1	Zellaufschluss mittels French-Press-Zelle	35
11.2	Zellaufschluss mittels Silamat	36
11.3	Proteinbestimmung nach Bradford	36
11.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
11.5	Ni-NTA-Affinitätschromatographie.....	37
11.6	Pufferaustausch durch Gelfiltration mit Hilfe von PD-10-Säulen	37
11.7	Enzymassays.....	38

V	Ergebnisse	40
1	Analyse der Itaconat-Toleranz von <i>C. glutamicum</i> und Fähigkeit zur Itaconat-Verstoffwechselung.....	40
2	Konstruktion und Analyse eines Itaconat-Produktionsstammes (1. Generation)	42
2.1	Analyse der Itaconat-Produktion von <i>C. glutamicum</i> /pEKEx2- <i>cad</i> _{opt} und <i>C. glutamicum</i> /pEKEx2-MSMEG_6856	43
2.2	Heterologe Überproduktion, Reinigung und Charakterisierung von N-His ₁₀ -MSMEG_6856 aus <i>Mycobacterium smegmatis</i> in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	46
3	Versuche zur Erhöhung der intrazellulären <i>cis</i> -Aconitat-Konzentration mit Hilfe von 2-Methylcitrat-Dehydratasen.....	48
3.1	Heterologe Überproduktion und Reinigung von PrpD1-, PrpD2- und 2-Mcd2-Derivaten.....	48
3.2	Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> /pEKEx2- <i>cad</i> _{opt} - <i>prpD2</i>	51
3.3	Austausch der corynebacteriellen Aconitase gegen heterologe Aconitasen	52
4	Steigerung der CAD-Aktivität mit Hilfe eines CAD-MalE-Fusionsproteins.....	53
5	Variation der Kultivierungsbedingungen für die Itaconat-Produktion	56
5.1	Kohlenstoffpulseexperimente	57
5.2	Stickstofflimitierung.....	57
6	Reduzierung der ICD-Aktivität zur Verbesserung der <i>cis</i> -Aconitat-Verfügbarkeit.....	60
6.1	Analyse der Stämme mit reduzierter ICD-Aktivität	61
7	Einfluss putativer Itaconat-Transporter aus <i>A. terreus</i> auf die Itaconat-Produktion mit <i>C. glutamicum</i>	64
8	Versuche zur Itaconat-Produktion bei Kultivierung in Bioreaktoren	65
VI	Diskussion	70
1	<i>C. glutamicum</i> als Wirtsorganismus für die Itaconat-Produktion.....	71
2	Konstruktion und Analyse der Produktionsstämme der 2. und 3. Generation	78
3	Schlussfolgerung und Perspektive	81
VII	Literaturverzeichnis	84

Inhaltsverzeichnis

VIII	Anhang	93
1	Gensequenz des für <i>C. glutamicum</i> Codon-Usage optimierten <i>cad</i> -Gens	93
2	Suche nach Homologen der <i>cis</i> -Aconitat-Decarboxylase (CAD)	93
3	Analyse der Codon-Usage des <i>cad</i> -Gens.....	95

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10^{-6}) oder Wachstumsrate
ATCC	American Type Culture Collection
BHIS	Brain Heart Infusion – Sorbitol
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
Btm	Biotrockenmasse
Da	Dalton
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m s}^{-1}$)
GIC	glass ionomer cement
h	Stunde(n)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-thio-β-D-galactopyranosid
k	Kilo (10^3)
l	Liter
m	milli (10^{-3})
M	Molar (mol l^{-1})
MCS	Multiple Cloning Site
Mio.	Millionen
min	Minute(n)
MOPS	3- <i>N</i> -Morpholinopropansulfonsäure
n	nano (10^{-9})
n.b.	nicht bestimmt
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenaktivität

RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
U	Unit (1 Unit = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$)
Upm	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

I Summary

Due to its chemical and physical properties and its broad range of applications, itaconic acid was classified as a promising building block molecule for the chemical industry that can be produced from renewable feedstocks like glucose. Biotechnologically produced itaconate might be able to replace chemicals derived from petroleum and thus can contribute to sustainability and a reduction of environmental pollution. In this work, metabolic engineering was used to design and develop itaconate-producing *Corynebacterium glutamicum* strains. The following results were obtained:

1. Itaconate is formed from *cis*-aconitate, an intermediate of the aconitase reaction converting citrate to isocitrate, by *cis*-aconitate decarboxylase (CAD). As *C. glutamicum* does not contain this enzyme, the *cad* gene from *Aspergillus terreus* was heterologously expressed in *C. glutamicum* wild type. The resulting strain secreted 1.4 mM of itaconate into the medium, confirming the functionality of CAD. However, the specific CAD activity in crude extracts was much lower than in *A. terreus*. Interestingly, itaconate was produced by *C. glutamicum* only in the stationary growth phase.
2. CAD activity could be increased by fusing the enzyme to the maltose binding protein MalE of *Escherichia coli* lacking its signal peptide. The strain containing the MalE-Cad fusion protein produced 3.6 mM of itaconate in the stationary phase.
3. To improve the glucose supply for itaconate production in the stationary phase, cells were grown under nitrogen-limitation. This led to reduced biomass formation and the presence of residual glucose after growth was increased. With this strategy *C. glutamicum* accumulated 30 mM of itaconate in the medium. The enhancement was attributed to an increased CAD activity in the crude extract and improved sugar availability.
4. To optimize the carbon flux towards itaconic acid production, isocitrate dehydrogenase activity (ICD) was reduced by a start codon exchange. In this way, the itaconate titer in the medium was increased to 60 mM.
5. In the last step, itaconate production was scaled up successfully from shake flasks with 60 ml medium to a bioreactor system with 600 ml medium. This process exposed the importance of dissolved oxygen for itaconate production by *C. glutamicum*.

II Zusammenfassung

Auf Grund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften und des weiten Anwendungsspektrums wurde Itaconsäure als ein vielversprechender Baustein, der aus erneuerbaren Rohstoffen wie Glucose produziert werden kann, für die chemische Industrie klassifiziert. Biotechnologisch hergestellte Itaconsäure könnte ölbasierte Chemikalien ersetzen und somit zu mehr Nachhaltigkeit und einer Reduzierung von Umweltverschmutzung beitragen. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe von „metabolic Engineering“ Itaconat-produzierende *Corynebacterium glutamicum*-Stämme entwickelt. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. Itaconat wird aus *cis*-Aconitat, einem Intermediat der Aconitase-Reaktion, die die Umwandlung von Citrat zu Isocitrat katalysiert, mit Hilfe der *cis*-Aconitat Decarboxylase (CAD) gebildet. Da *C. glutamicum* dieses Enzym nicht enthält, wurde das *cad* Gen aus *Aspergillus terreus* heterolog im *C. glutamicum* Wildtyp exprimiert. Der resultierende Stamm sekretierte 1,4 mM Itaconat in den Kulturüberstand und bestätigte somit die Funktionalität von CAD. Die spezifische CAD-Aktivität im Rohextrakt war jedoch viel niedriger als in *A. terreus*. Interessanterweise wurde Itaconat ausschließlich während der stationären Wachstumsphase produziert.
2. Die CAD-Aktivität im Rohextrakt konnte durch Fusion an das Maltose-Bindeprotein MalE ohne Signalpeptid aus *Escherichia coli* erhöht werden. Der verbesserte Stamm, der das MalE-Cad Fusionsprotein enthielt, produzierte nun 3,6 mM Itaconat in der stationären Phase.
3. Um die Glucose-Bereitstellung für die Itaconat-Produktion in der stationären Phase zu gewährleisten wurden die Zellen unter Stickstoffmangel kultiviert. Dies führte zu einer reduzierten Biomasseproduktion im Medium und zu einer Erhöhung der Glucoseverfügbarkeit während der stationären Phase. Dadurch akkumulierte der Produktionsstamm bis zu 30 mM Itaconat im Kulturüberstand. Die Steigerung des Titors war vor allem auf eine erhöhte CAD-Aktivität im Rohextrakt und der erhöhten Glucose Verfügbarkeit zurückzuführen.
4. Um den Kohlenstofffluss weiterhin für die Itaconat-Produktion zu optimieren, wurde die Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase (ICD) durch Austausch des Startcodons reduziert. Dadurch konnte der Itaconat-Titer auf bis zu 60 mM gesteigert werden.

5. Im letzten Schritt konnte die Itaconat-Produktion erfolgreich von 60 ml Medium im Schüttelkolben auf 600 ml Medium in einem Bioreaktor-System erweitert werden. Dabei stellte sich heraus, dass die Menge an gelöstem Sauerstoff ein wichtiger Baustein bei der Produktion von Itaconat in *C. glutamicum* ist.

III Einleitung

1 Petrochemie und die Zukunft von Bioraffinerien

In Zeiten des immer weiter ansteigenden Energiebedarfs und der kleiner werdenden Ölreserven ist eine effiziente und vorausschauende Nutzung des restlichen Rohöls notwendig. Nach unterschiedlichsten Berechnungen wird das globale Ölfördermaximum, der Hubbert Peak, in den nächsten Jahren erreicht oder wurde bereits überschritten (Hubbert 1969; Bookout, 1989; Edwards, 1997; Campbell und Laherrere, 1998; Zagar und Campbell, 2005; BP, 2012). Einige Länder haben das lokale Ölfördermaximum bereits überschritten und können nur noch wenige Jahre an dieser Grenze agieren (Al-Husseini, 2006). Für die Zukunft bedeutet dies, dass die Reserven des konventionell zugänglichen Öls in den nächsten Jahrzehnten ausgeschöpft und die Preise für Rohöl und dessen raffinierte Produkte stetig ansteigen werden. Neben der Sorge, dass die Erdölreserven schwinden und alle petrochemischen Produkte teurer werden, steigt in unserer Gesellschaft die Nachfrage nach „grünen“ Produkten, die ein Zeichen für erhöhtes Umweltbewusstsein und Nachhaltigkeit sind (Villela Filho *et al.*, 2011). Während Erdöl im Energiesektor durch erneuerbare Energiequellen, wie Wind-, Solar- und Wasserenergie, Biogas und Biomasse ersetzt werden kann, ist eine Substitution im Bereich des Transportwesens, das zu 97% auf Erdöl und Erdgas beruht, zurzeit nicht zu realisieren. Weitere 5% des in Raffinerien umgesetzten Öls finden ihre Bestimmung in sogenannten petrochemischen Produkten und Baustoffen (Sauer *et al.*, 2008). Darunter befinden sich unter anderem die industriell relevanten Bulkwaren Ethanol, Benzol, Buten, Toluol, Xylol und Propylen, die alle zu weiteren Folgeprodukten umgesetzt werden können. Propylen kann beispielsweise zu Acrylsäure umgesetzt werden, die bei der Herstellung von Kunststoffen, Beschichtungen, Klebstoffen, Elastomeren und artifiziell Glas benötigt wird (Sauer *et al.*, 2008).

Mit Hilfe der Biotechnologie können Chemikalien, die auf petrochemischen Molekülen basieren, durch solche ersetzt werden, die in Bioraffinerien aus Biomasse gewonnen werden. Der Vorteil dieser aus Bioraffinerien erhaltenen Produkte ist zum einen, dass sie eine neutrale CO₂-Bilanz haben und zum anderen, dass biologische Prozesse auf Grund milderer Reaktionsbedingungen und Wasser als Lösungsmittel oft energieeffizienter sind und weniger giftige Abfallprodukte generieren (Ahmann und Dorgan, 2007; Du *et al.*, 2011). Das U.S. Department of Energy veröffentlichte 2004 eine Studie, bei der die

vielversprechendsten Basischemikalien beschrieben wurden, die aus Biomasse gewonnen werden können (Werpy und Petersen, 2004). Darunter befanden sich unter anderem die organischen Säuren Bernsteinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure und Itaconsäure. Besonders hervorzuheben ist hierbei die Itaconsäure, da sie vielfältig eingesetzt werden kann und, weil die kürzlich veröffentlichte Proteinsequenz eines Itaconsäure generierenden Enzyms neue biotechnologische Möglichkeiten hervorbrachte (Kanamasa *et al.*, 2008). Der größte Vorteil biobasierter Itaconsäure könnte darin liegen, petrochemisch hergestellte Acrylsäure zu ersetzen, welche ein Marktvolumen von über 4,2 Millionen Tonnen besitzt (Sauer *et al.*, 2008).

2 Itaconsäure

Itaconsäure ($C_5H_6O_4$), auch 2-Methylen-Succinylsäure oder Methylenbernsteinsäure genannt, ist eine C_5 -Dicarbonsäure, die zwei Carboxylgruppen und eine konjugierte Doppelbindung besitzt (Abb. 1).

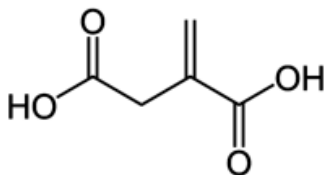


Abbildung 1: Strukturformel der Itaconsäure.

Itaconsäure hat ein Molekulargewicht von $130,1 \text{ g mol}^{-1}$, kommt als weißes kristallines Pulver vor und besitzt auf Grund seiner niedrigen pKs-Werte (3,84 und 5,55) die Eigenschaft wässrige Lösungen bereits in geringsten Mengen anzusäuern. 80 mg dieser Säure reduzieren den pH-Wert von einem Liter Wasser auf pH 2 (Willke und Vorlop, 2001). Auf Grund ihrer Molekülstruktur ist Itaconsäure zudem sehr reaktiv und ermöglicht ein großes Spektrum an Reaktionen (Tate, 1970; Rüdiger, 2000). Durch Reduktion beispielsweise können unter anderem Derivate der Bulkchemikalien γ -Butyrolacton, 1,4-Butandiol und Tetrahydrofuran gebildet werden. Das Produktionsvolumen dieser Stoffe beträgt alleine 500.000 Tonnen pro Jahr (McKinlay *et al.*, 2007). Andere mögliche Reaktionen sind Polymerisationen, Additionsreaktionen, Veresterungen, Salz- und Anhydridbildung. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf den Polymerisationsreaktionen, da auf Grund der verschiedenen funktionellen Gruppen und dem prochiralen Kohlenstoffzentrum sogar stereospezifische

Reaktionen stattfinden können (Ferraboschi *et al.*, 1994). Ein Vorteil von Itaconsäure gegenüber Acrylsäure ist neben der Herstellung aus Biomasse auch die Tatsache, dass Itaconsäure nicht giftig und biologisch abbaubar ist. Itaconsäure wird bereits heute für verschiedenste Anwendungen verwendet (Tab. 1).

Tabelle 1: Anwendungsgebiete von Itaconsäure und Itaconsäure-Derivaten.

Anwendungsgebiet	Referenz
<u>Chemische Industrie</u>	
Klebstoffe	Pitzl, 1951
Artifizielles Glas	Kin <i>et al.</i> , 1998
Industriereiniger	Willke und Vorlop, 2001
Synthetische Fasern, Gummi, Kunststoffe, Öl-Beimischungen, Ionen-Austauschreagenz	Okabe <i>et al.</i> , 2009
<u>Pharmazeutischer Sektor</u>	
Arzneistofffreisetzung	Tasdelen <i>et al.</i> , 2004 De <i>et al.</i> , 2004 Stanojevic <i>et al.</i> , 2006
Zahntechnik (Glas Ionomer Cement)	Culbertson, 2006
<u>Konsumgüter</u>	
Reinigungsmittel	Lancashire, 1969
Beschichtungen/Isolierungen	Smith <i>et al.</i> , 1974
Shampoo	Christiansen, 1980
Kontaktlinsen	Novicky, 1981 Ellis <i>et al.</i> , 1994
Kalk-Inhibitor in Kesseln	Walinsky, 1984
Pestizide	Sen und Yakar, 2001

Das Spektrum der möglichen Anwendungen reicht von Konsumgütern über die pharmazeutische bis hin zur chemischen Industrie. Auf Grund des hohen Marktpreises von circa 2 US\$/kg ist die Nutzung der Itaconsäure in der chemischen Industrie, bei der große Mengen benötigt werden, zurzeit jedoch noch eingeschränkt. Um petrochemisch hergestellte Bulkwaren wie Acrylsäure zu ersetzen, müsste der Preis der Itaconsäure bei einem Ölpreis von 40 US\$ auf 0,5 US\$/kg sinken (Werpy und Petersen, 2004). Da der Preis

für Acrylsäure jedoch in den letzten Jahren stark gestiegen ist und bei etwa 2000 US\$ pro metrischer Tonne liegt, wird die Nutzung alternativer biobasierter Bausteine, wie Itaconsäure, immer interessanter. Neue biotechnologische Innovationen, wie die Nutzung alternativer Kohlenstoffquellen, bessere Fermentationstechniken und die Entwicklung neuer Itaconsäure-produzierender Mikroorganismen könnten den Marktpreis weiter reduzieren. Zurzeit werden 80.000 Tonnen Itaconsäure pro Jahr produziert, wobei ca. 40% bei der Herstellung von Nitrilon, einer synthetischen Faser aus Acrylnitril, Methylacrylat und Itaconat, 30% für Ionen-Austausch Material, 10% bei der Papierherstellung, 10% bei der Wasseraufbereitung und weitere 10% in anderen Feldern genutzt werden (Okabe *et al.*, 2009).

2.1 Chemische Synthese

Itaconsäure kann chemisch oder biologisch hergestellt werden. Die chemische Herstellung ist bereits seit 1837 bekannt, als sie bei der Thermolyse von Citronensäure entdeckt wurde (Baup, 1837). Seitdem sind diverse chemische Synthesen mit verschiedenen Ausgangsstoffen entwickelt worden. Die erste wichtige Syntheseform ist die Destillation von Citronensäure, wobei das entstehende Citronensäureanhydrid in einem Folgeschritt durch Wasserbehandlung zu Itaconsäure umgesetzt wird (Blatt, 1943). Propargylchlorid kann in Anwesenheit des hochgiftigen Katalysators Nickeltetracarbonyl mit Kohlenstoffmonoxid und Wasser zu Itaconsäure reagieren (Chiusoli, 1962). Weitere Ausgangsstoffe für die Herstellung der Itaconsäure sind Isopren (Pichler *et al.*, 1967) und Mesityloxid (Berg und Hetzel, 1978). Neben der Tatsache, dass bei all diesen chemischen Verfahren entweder giftige Katalysatoren oder sehr harsche Reaktionsbedingungen genutzt und somit Umweltbelastungen in Kauf genommen werden müssen, haben sich diese Verfahren auch wirtschaftlich nicht gegen die biotechnologische Herstellung mit Pilzen durchsetzen können (Tate, 1981). Im Jahr 2006 wurde erstmals ein chemischer Modell-Prozess vorgestellt, der aus wirtschaftlicher Sicht mit der biotechnologischen Produktion konkurrieren könnte. Dabei sollte Itaconsäure ausgehend von Dimethylsuccinat und Formaldehyd synthetisiert werden (Shekhawat *et al.*, 2006). Die berechneten Produktionskosten waren jedoch nur dadurch konkurrenzfähig, weil von einer Produktionsmenge von 18 Millionen Tonnen Itaconsäure pro Jahr ausgegangen wurde, während die biotechnologische Produktion mit *Aspergillus terreus* noch bei weit unter 80.000 Tonnen pro Jahr lag (Okabe *et al.*, 2009).

2.2 Biotechnologische Herstellung

Die biotechnologische Herstellung von Itaconsäure geht auf die Entdeckung des Pilzes *Aspergillus itaconicus* zurück, der Itaconsäure in das Kulturmedium ausschied, wenn er auf Kaliumnitrat als Stickstoffquelle kultiviert wurde (Kinoshita, 1931). In den darauffolgenden Jahren wurden weitere *Aspergillus*-Stämme auf ihr Itaconsäure-Produktionsvermögen getestet. Von sechs verschiedenen *A. terreus* Stämmen zeigte ausschließlich der Stamm *A. terreus* THOM das Vermögen diese Säure zu bilden, während die anderen Stämme Bernsteinsäure, Fumarsäure und Oxalsäure produzierten (Calam *et al.*, 1939). In einer weiteren umfassenden Studie wurden 308 verschiedene *A. terreus*-Stämme untersucht, von denen insgesamt 11 Itaconsäure produzierten. Der vielversprechendste war der Stamm *A. terreus* NRRL 1960 (Lockwood und Reeves, 1945). In den folgenden Jahren wurde in erster Linie untersucht, unter welchen Bedingungen Itaconsäure bevorzugt produziert wird. Wichtige Elemente dabei waren der pH-Wert und die Kohlenstoffquelle (Lockwood und Reeves, 1945; Larsen und Eimhjellen, 1954a; Larsen und Eimhjellen 1954b; Riscaldati *et al.*, 2000). Der Durchbruch bei der Itaconsäure-Produktion wurde jedoch durch Zufalls-Mutagenese erzielt. Dabei wurde der Stamm *A. terreus* IFO 6365, bei dem die Itaconsäure-Produktion in der Anwesenheit hoher Itaconsäure-Konzentrationen „feedback“-inhibiert wurde, einem *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin-Gradienten auf Agarplatten ausgesetzt. So konnte der Stamm *A. terreus* TN-484 isoliert werden, der bis zu 82 g l^{-1} Itaconsäure produzieren konnte (Yahiro *et al.*, 1995). Da die Genomsequenz von *A. terreus* nicht bekannt und „metabolic Engineering“ daher erschwert war, lag der Fokus bei der Verbesserung der Itaconsäure-Produktion vor allem auf dem Produktionsprozess. Dies war notwendig, da der Fermentationsprozess von Pilzen auf Grund der langen Kultivierungsdauer hohe Kosten verursacht und auf Grund der durch Rühren auftretenden Scherkräfte sogar Probleme hervorrufen kann (Okabe *et al.*, 2009). Verschiedene Techniken wurden getestet, wobei sowohl freie Zellen als auch immobilisierte Zellen genutzt wurden. Als besonders effektiv stellte sich der „Air-Lift“-Reaktor heraus, mit dem die Produktionsphase von 7 auf 4 Tage reduziert und die Produktionsrate von $0,57 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $0,64 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gesteigert werden konnte. Der finale Titer wurde jedoch von 82 g l^{-1} auf 64 g l^{-1} reduziert (Yahiro *et al.*, 1997). Beim neuesten Produktionsprozess konnten Titer von $86,2 \text{ g l}^{-1}$ mit einer molaren Ausbeute von 86 mol%, bezogen auf die eingesetzte Glucose, in 7 Tagen erreicht werden. Dieser Prozess überzeugte vor allem durch die vorher nicht erreichte hohe Reproduzierbarkeit bei

der Itaconsäure-Produktion (Kuenz *et al.*, 2012). Neben *A. terreus* besitzen auch andere Mikroorganismen die Fähigkeit Itaconsäure zu produzieren. Eine Zusammenstellung dieser Organismen, zu denen auch Hefen gehören, ist in Tabelle 2 (nach Okabe *et al.*, 2009) aufgelistet.

Tabelle 2: Itaconsäure-Produzenten; Zusammenstellung nach Okabe *et al.*, 2009.

Organismus	finaler Titer [g l ⁻¹]	Produktionszeit	Referenz
<i>Ustilago zae</i>	15	n.d.	Okabe <i>et al.</i> , 2009
<i>Ustilago maydis</i>	53	5 Tage	Tabuchi und Nakahara 1980
<i>Candida sp.</i>	35	5 Tage	Tabuchi, 1981
<i>Candida</i> -Mutante	42	6 Tage	Hashimoto <i>et al.</i> , 1989
<i>Rhodotorula sp.</i>	15	7 Tage	Kawamura <i>et al.</i> , 1981
<i>A. terreus</i> TN-484-M1	82	6 Tage	Yahiro <i>et al.</i> , 1995
<i>Pseudozyma antarctica</i>	17	6 Tage	Levinson <i>et al.</i> , 2006

2.3 Biosyntheseweg

Trotz geringer Kenntnisse wie die Itaconsäure-Produktion in *A. terreus* stattfindet, konnten Verbesserungen durch Mutagenese und verschiedene Verfahrenstechniken erzielt werden (Yahiro *et al.*, 1995; Willke und Vorlop 2001; Okabe *et al.*, 2009). Um einen besonders effizienten Produzenten zu entwickeln, ist es jedoch auch nützlich, detaillierte Kenntnisse über den Biosyntheseweg der gewünschten Substanz zu haben. Mit diesen Kenntnissen können „Bottlenecks“ beispielsweise durch „metabolic engineering“ geschlossen und der Produktionsprozess optimiert werden. Der Biosyntheseweg der Itaconsäure wurde über 70 Jahre lang von verschiedenen Gruppen untersucht. Schon Kinoshita schlug einen Biosyntheseweg vor, bei dem Itaconsäure bei der Verstoffwechselung von Glucose über die Metabolite Citronensäure und *cis*-Aconitat gebildet wird (Kinoshita, 1931). Seine Vermutung beruhte auf der Tatsache, dass unter verschiedenen Produktionsbedingungen entweder Citronensäure oder Itaconsäure im Kulturüberstand akkumulierte. Weitere Experimente deuteten darauf hin, dass eine nicht näher definierte aktivierte Form der Citronensäure eine Biosynthesestufe von Itaconsäure sein könnte (Corzo und Tatum, 1953; Larsen und Eimhjellen, 1954b). Kurze Zeit später konnten Bentley und Thiessen mit Hilfe von ¹⁴C-markierter Glucose zeigen, dass die Itaconsäure-Biosynthese über die Dehydrierung von Citronensäure zu *cis*-Aconit-Säure und anschließender Decarboxylierung zu Itaconsäure verläuft. Diese Untersuchungen waren besonders interessant, da sie die erste enzymatische

Decarboxylierung beschrieben, die zu einer Methylengruppe führte (Bentley und Thiessen 1955, 1957abc). Einen gänzlich anderen Biosyntheseweg schlugen Shimi und Nour El Dein vor. Sie mutmaßten die Kondensation von Acetat und Succinat zu 1,2,3-Tricarboxypropionat und einer anschließenden Dehydrogenierung zu *cis*-Aconitat und Itaconat (Shimi und Nour El Dein, 1962). Dieser Stoffwechselweg widerspricht jedoch auf Grund der publizierten Ausbeuten den maximal theoretischen Werten und konnte so ausgeschlossen werden (Bonnarne *et al.*, 1995). Eine weitere Theorie war die Synthese von Itaconsäure aus Citramalat, weil isolierte Mitochondrien und Zellrohextrakte aus *A. terreus* bei einigen Experimenten keine Citrat-Zyklus-Metabolite zu Itaconsäure umsetzten. (Nowakowska-Waszczyk, 1973; Jakubowska und Metodiewa, 1974). Spätestens seit 1995 ist jedoch die von Kinoshita sowie Bentley und Thiessen vorgeschlagene Biosynthese über den Citrat-Zyklus und *cis*-Aconitat als direkte Biosynthesevorstufe als am Wahrscheinlichsten anzusehen (Abbildung 2), nachdem durch ^{13}C - und ^{14}C -markierte Glucose und NMR-Spektroskopie gezeigt werden konnte, dass markierte C-Atome aus verschiedenen Zentralstoffwechsel-Metaboliten wie Citronensäure, Pyruvat und Acetat auch in Itaconsäure wiedergefunden wurden (Bonnarne *et al.*, 1995).

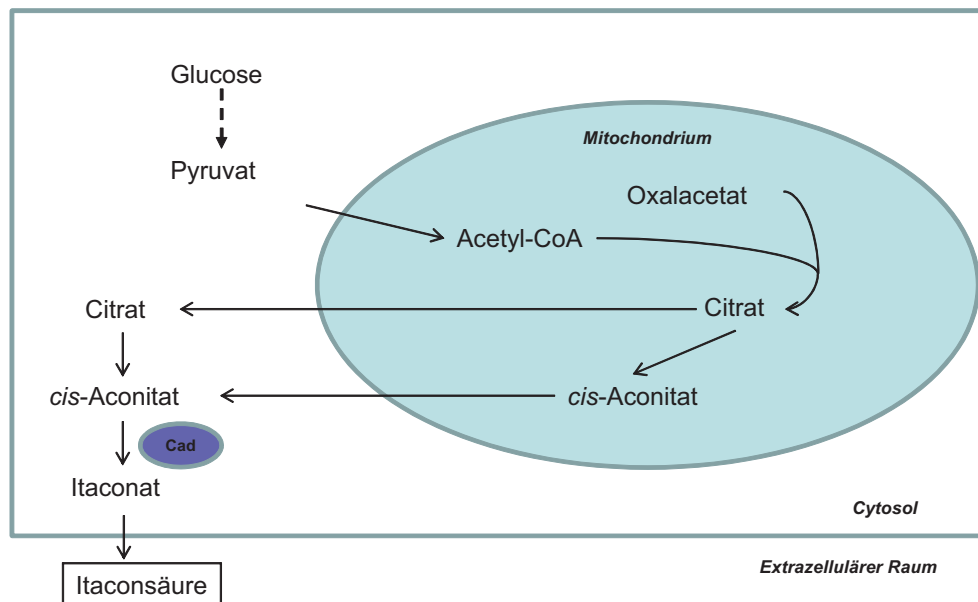


Abbildung 2: Postulierter Biosyntheseweg für Itaconsäure in *Aspergillus terreus* nach Bentley und Thiessen, 1957a, b, c; Winskill, 1983; Jaklitsch *et al.*, 1991; Bonnarne *et al.*, 1995.

3 *cis*-Aconitat-Decarboxylase (CAD)

Schon 1955 zeigten Bentley und Thiessen, dass *cis*-Aconitat mit einer Enzympräparation aus *Aspergillus terreus* zu Itaconat umgesetzt werden kann. Sie konnten das entsprechende Enzym jedoch nicht zur Homogenität reinigen und nachweisen (Bentley und Thiessen, 1955). Erst 47 Jahre später konnte die *cis*-Aconitat-Decarboxylase aus *A. terreus* durch Ammoniumsulfat-Präzipitation mit anschließender Reinigung über Ionenaustauschchromatographie, Hydrophobizitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie bis zur Homogenität gereinigt und charakterisiert werden. Die *cis*-Aconitat-Decarboxylase (EC 4.1.1.6) ist das einzige bekannte Enzym, das *cis*-Aconitat zu Itaconat umsetzen kann (Abb. 3).

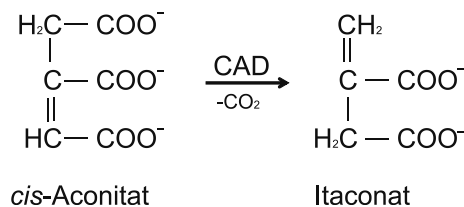


Abbildung 3: Reaktionsgleichung der *cis*-Aconitat-Decarboxylase aus *A. terreus*. Dabei wird *cis*-Aconitat zu Itaconat decarboxyliert.

Das Enzym besteht aus 490 Aminosäuren mit einer berechneten Masse von 52,75 kDa, hat einen K_m -Wert von 2,45 mM für *cis*-Aconitat und zeigt pH- und Temperatur-Optima bei pH 6,2 und 45 °C (Dwiarti *et al.*, 2002). Die gereinigte *cis*-Aconitat-Decarboxylase liegt als Monomer vor und hat eine Aktivität von 40,9 U mg⁻¹ Protein, während im Rohextrakt Werte von 2,1 U mg⁻¹ Protein gemessen werden konnten. Das Enzym konnte durch die Thiol-spezifischen Agenzien *p*-Chloromercuribenzoat, 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoat), Phenylhydrazin, Zinksulfat, Kupfersulfat und Quecksilbersulfat komplett inaktiviert werden, was darauf hindeutete, dass Cysteinreste im aktiven Zentrum des Proteins aktiv sind. Andere Metallionen in Form von Calciumchlorid, Magnesiumsulfat, Mangansulfat oder Eisensulfat hatten nur einen geringen bzw. keinen Einfluss auf die Enzymaktivität (Dwiarti *et al.*, 2002). Nachdem das Protein zur Homogenität gereinigt wurde, konnten partielle Aminosäuresequenzen bestimmt und mit daraus abgeleiteten Oligonukleotiden das Gen für CAD in *A. terreus* identifiziert werden. Dieses wurde sequenziert und in *Saccharomyces cerevisiae* eingebracht (Kanamasa *et al.*, 2008). Der resultierende Stamm war nun in der

Lage, Itaconsäure zu produzieren, wodurch die Funktion des Gens *cad1* bestätigt wurde. Weiterhin wurde mit dem WoLF PSORT-Algorithmus vorausgesagt, dass das CAD-Protein im Cytosol lokalisiert und somit vom Citrat-Zyklus räumlich getrennt ist (Kanamasa *et al.*, 2008). Mit Hilfe weiterer Computeranalysen wurde ebenfalls prognostiziert, dass 8 der 12 Cysteine in die Bildung von 4 Disulfidbrücken involviert sind, während die anderen 4 eventuell mit dem aktiven Zentrum des Enzyms interagieren (Kanamasa *et al.*, 2008). Kurze Zeit später wurden bei Transkriptom-Analysen, in denen *A. terreus*-Stämme mit hoher und geringer Itaconsäure-Produktion verglichen wurden, erhöhte *cad*-mRNA-Level in den besseren Produzenten nachgewiesen (Li *et al.*, 2011). CAD-Proteine aus anderen Itaconsäure-produzierenden Organismen sind bisher nicht bekannt. Trotz ihrer einzigartigen Funktion, der Decarboxylierung von *cis*-Aconitat zu Itaconat besitzt CAD eine bekannte Domäne, die MmgE/PrpD-Domäne, welche aus 2-Methylcitrat-Dehydratasen bekannt ist. Diese katalysieren die Reaktion von 2-Methylcitrat zu 2-Methyl-*cis*-Aconitat.

4 *Corynebacterium glutamicum* als Itaconat-Produzent

Corynebacterium glutamicum ist ein Gram-positives, fakultativ anaerobes, unbewegliches Bodenbakterium, das zur Ordnung der Actinomyceten gehört und GRAS-Status (general recognized as safe) besitzt (Kinoshita *et al.*, 1957; Kalinowski *et al.*, 2003). *C. glutamicum* dient als Modellorganismus für die verwandten humanpathogenen Spezies *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae* (Eggeling und Bott, 2005). Seit seiner Entdeckung findet es jedoch vor allem in der Biotechnologie Verwendung. Über 2,2 Millionen Tonnen des Geschmacksverstärkers L-Glutamat und 1,5 Mio. Tonnen des Futtermitteladditivs L-Lysin werden zurzeit jährlich mit Hilfe von *C. glutamicum* produziert (Litsanov *et al.*, 2012c). Die Sequenzierung des Genoms (Ikeda und Nakagawa 2003; Kalinowski *et al.*, 2003; Yukawa, 2007), die globale Untersuchung des Stoffwechsels (Eggeling und Bott 2005; Burkovski, 2008) und die Entwicklung bzw. Etablierung von Werkzeugen, die gezielte genetische Veränderungen ermöglichen (Kirchner und Tauch, 2003), führten dazu, dass die Produktion weiterer Metabolite durch „metabolic engineering“ ermöglicht wurde. Darunter befinden sich verschiedene Vitamine (Sahm und Eggeling, 1999), L-Phenylalanin (Shu und Liao, 2002), Ethanol (Inui *et al.*, 2004), Isoleucin (Ebbinghausen *et al.*, 1989), L-Serin (Peters-Wendisch *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2012), Trehalose (Carpinelli *et al.*, 2006), L-Valin

(Blombach *et al.*, 2008), L-Alanin (Jojima *et al.*, 2010), Isobutanol (Smith *et al.*, 2010; Blombach *et al.*, 2011), 2-Ketoisovalerat (Krause *et al.*, 2010), Putrescin (Schneider und Wendisch 2010; Schneider *et al.*, 2012), D-Aminosäuren (Stäbler *et al.*, 2011), Pyruvat (Wieschalka *et al.*, 2012a), γ -Aminobuttersäure (Takahashi *et al.*, 2012) und Succinat (Litsanov *et al.*, 2012a, b, c). Dies unterstreicht die besondere Eignung von *C. glutamicum* für die Produktion von Aminosäuren und organischen Säuren aus dem Zentralstoffwechsel. Die Tatsache, dass Succinat, ein Zwischenprodukt des TCA-Zyklus, von *C. glutamicum* mit sehr hohen Titern ($>100 \text{ g l}^{-1}$) produziert werden kann, deutet darauf hin, dass dieser Organismus auch für die Produktion von Itaconat geeignet sein könnte.

5 Ziele der Arbeit

Auf Grund des gut untersuchten Metabolismus und der generellen Wachstums- und Fermentationseigenschaften ist *C. glutamicum* nachweislich für die biotechnologische Produktion industrieller Mengen von Bulkchemikalien geeignet. Dabei können nicht nur Aminosäuren wie Glutamat und Lysin, sondern auch organische Säuren wie Succinat produziert werden. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, das Potential von *C. glutamicum* für die Produktion von Itaconat zu testen. Dazu sollte das bisher einzige charakterisierte Itaconat-produzierende Enzym, die *cis*-Aconitat-Decarboxylase aus *A. terreus*, heterolog in *C. glutamicum* überproduziert werden. Weiterhin sollte der Produktionsstamm so modifiziert werden, dass ein optimaler Kohlenstofffluss für die Itaconat-Produktion entsteht und metabolische „Bottlenecks“ reduziert werden können. Schließlich sollte der Produktionsstamm unter definierten Bedingungen in einem Bioreaktor kultiviert werden, um so weitere Einblicke in die Charakteristika der Itaconat-Produktion mit *C. glutamicum* zu erhalten.

IV Material und Methoden

1 Puffer und Stammlösungen

Puffer und Stammlösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit bidest. Wasser angesetzt.

5 x SDS-Ladepuffer:	225 mM Tris-HCl, 5% (w/v) SDS, 250 mM (v/v) DTT, 50% (v/v) Glycerin, 0,05% (v/v) Bromphenolblau, pH 6,8
50 x TAE-Puffer:	37,2 g l ⁻¹ Na ₂ EDTA 2H ₂ O, 242 g l ⁻¹ Tris, mit Eisessig auf pH 8,5 einstellen
Ampicillin:	10 mg ml ⁻¹ (sterilfiltriert)
Ammoniumpersulfat:	10% (w/v) (aliquotiert bei -20°C)
Biotin:	200 mg l ⁻¹ (sterilfiltriert)
Glucose:	50% (w/v) (autoklaviert)
Kanamycin:	10 mg ml ⁻¹ (sterilfiltriert)
Lysis-Puffer:	20 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM Na ₂ EDTA
Lysozym:	20 mg ml ⁻¹ Lysozym (frisch angesetzt)
SDS:	10% (w/v)
„Strip“-Puffer:	20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, 100 mM Na ₂ EDTA
TG-Puffer:	1 mM Tris-HCl pH 7,5, 10% (v/v) Glycerin (autoklaviert)
TNIX-Puffer:	20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, X mM Imidazol

2 Nährmedien

SOC-Medium:	20 g l ⁻¹ Trypton (Difco), 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt (Difco), 0,6 g l ⁻¹ NaCl (Merck), 0,2 g l ⁻¹ KCl (Merck), nach dem Autoklavieren 1 g l ⁻¹ MgCl ₂ (Merck) (sterilfiltriert) und 4 g l ⁻¹ Glucose (Merck) (separat autoklaviert) zugeben
LB-Medium:	10 g l ⁻¹ Trypton (Difco), 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt (Difco), 10 g l ⁻¹ NaCl (Merck)

BHIS-Medium:	37 g l ⁻¹ BHI (Difco) und 91 g l ⁻¹ Sorbitol (Merck) (separat autoklaviert)
mCGXII-Medium:	5 g l ⁻¹ (NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck), 5 g l ⁻¹ Harnstoff (Merck), 1 g l ⁻¹ KH ₂ PO ₄ (Merck), 1 g l ⁻¹ K ₂ HPO ₄ (Merck), 0,25 g l ⁻¹ MgSO ₄ 7H ₂ O (Merck), 10 mg l ⁻¹ CaCl ₂ (Merck), 42 g l ⁻¹ MOPS (Roth), 0,2 mg l ⁻¹ Biotin (Merck), pH 7 (mit KOH einstellen), nach dem Autoklavieren 1 ml l ⁻¹ Spurensalzlösung und 40 g l ⁻¹ Glucose (Merck) zugeben
Spurensalzlösung:	10 g l ⁻¹ FeSO ₄ 7H ₂ O (Merck), 0,1 g l ⁻¹ MnSO ₄ H ₂ O (Merck), 1 g l ⁻¹ ZnSO ₄ 7H ₂ O (Merck), 0,2 g l ⁻¹ CuSO ₄ (Merck), 20 mg l ⁻¹ NiCl ₂ 6H ₂ O (Merck), zum Lösen mit HCl ansäuern (pH 1)

Für entsprechende Nährböden wurde den Medien 15 g l⁻¹ Agar-Agar (Difco) zugesetzt. Wenn erforderlich, wurde den Nährmedien Kanamycin zu einer Endkonzentration von 50 µg ml⁻¹ (*E. coli*) oder 25 µg ml⁻¹ (*C. glutamicum*) bzw. Ampicillin zu einer Endkonzentration von 100 µg ml⁻¹ (*E. coli*) zugesetzt.

3 Oligonukleotide

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon bezogen. Die Sequenzen sind in 5' → 3'- Richtung dargestellt. Eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und die dazugehörigen Restriktionsendonukleasen nachfolgend genannt.

Name	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle
Primer zur Konstruktion von pEKEx2-MSMEG_6856		
MSMEG_6856-fw	TATA <u>CTGCAGA</u> AAGGAGACATATGGGTCAGGTGAACACATTG	PstI
MSMEG_6856-rv	TATAG <u>AATTCTC</u> AGTCCAGAACCCCTTCCCAC	EcoRI
Primer zur Konstruktion von pET16b-MSMEG_6856		
MSMEG_6856-fw-2	TATACATATGGGTCAGGTGAACACATTG	NdeI
MSMEG_6856-rv-2	TATAGGATCCTCAGTCCAGAACCCCTTCCCAC	BamHI

Name	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle
Primer zur Konstruktion von pET-TEV1-MSMEG_6645		
MSMEG_6645-fw	TATACATATGCGGATCATGCGTATTACG	NdeI
MSMEG_6645-rv	TATAGAATTCTCATTGGAAAATCCCCGAGGG	EcoRI
Primer zur Konstruktion von pET-TEV1- <i>prpD1</i>		
<i>prpD1</i> -fw	TATACATATGCGCATCCACGATGTTTATAC	NdeI
<i>prpD1</i> -rv	TATAGAATTCTCATAACAGCCCCGCTTTCGT	EcoRI
Primer zur Konstruktion von pK19 <i>mobsacB-icd</i>		
P1- <i>icd</i> -fw	TATAGGATCCAGCCACCAAGGTGATCTTGGC	BamHI
P2- <i>icd</i> -rv	TATAGAATTCCAGCAGCGTCGAGGATGATGG	EcoRI
Primer zum Austausch des Startcodons des <i>icd</i> -Gens auf dem Plasmid pK19 <i>mobsacB-icd</i>		
P3- <i>icd</i> -fw	CCAAGGAGACTCGTGGCTAAGATC	
P4- <i>icd</i> -rv	GATCTTAGCCACGAGTCTCCTTGG	
P5- <i>icd</i> -fw	CCAAGGAGACTCTTGGCTAAGATC	
P6- <i>icd</i> -rv	GATCTTAGCCAAGAGTCTCCTTGG	
Primer zur Konstruktion von pEKEx2- <i>malE</i> bzw. pEKEx2- <i>malEcad_{opt}</i>		
P1- <i>malE</i> -fw	AAAACTGCAGAAGGAGATCAATGAAAAGTGAAGAAGGTAAACTGG	PstI
P2- <i>malE</i> -rv	AAAAGGATCCGCCCTGAAAATACAGGTTCTCAGTCTGCGCGTCTTTCAGGGC	BamHI
P3- <i>malEcad_{opt}</i> -fw	AAAAGGATCCATGACCAAGCAGTCCGCAGATTC	BamHI
P4- <i>malEcad_{opt}</i> -rv	AAAAGAATTCTTACACCAAGTGGGACTTCACTG	EcoRI
Primer zur Konstruktion von pEKEx2- <i>cad_{opt}2</i> bzw. pEKEx2- <i>cad_{opt}-aco1</i> , pEKEx2- <i>cad_{opt}-aco2</i> , pEKEx2- <i>cad_{opt}-aco3</i> und pEKEx2- <i>cad_{opt}-prpD2</i>		
P1- <i>cad_{opt}2</i> -fw	AAAACTGCAGAAGGAGATCAATGACC	PstI
P2- <i>cad_{opt}2</i> -rv	AAAAGGATCCGAGCTCTTACACCAAGTGGGACTTCACTG	BamHI, SacI
P3- <i>aco1</i> -fw	AAAAGGATCCAAAGGAGATCACATATGGGTGCACTGGCACCAAAG	BamHI
P4- <i>aco1</i> -rv	AAAAGAATTCTTAGTTGGATGCTGCCTTGCGTG	EcoRI
P5- <i>aco2</i> -fw	AAAAGGATCCAAGGAGATCACATATGATCTCCACCCGCTTGGCAC	BamHI
P6- <i>aco2</i> -rv	AAAAGAATTCTTAGTTGGATGCTGCCTTGCGTG	EcoRI
P7- <i>aco3</i> -fw	AAAAGGATCCAAGGAGATCACATATGGTGACCCAGCTGTGGCAAC	BamHI
P8- <i>aco3</i> -rv	AAAAGAATTCTTAGTGATCATGCCTCCGGTG	EcoRI

Name	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle
P9- <i>prpD2</i> -fw	AAAAGAGCTCAAGGAGATCAATGATTAACCACGAAGTGCGCAC	SacI
P10- <i>prpD2</i> -rv	AAAAGAATTCTCAGAACAGTCCTCCGGAATC	EcoRI

Primer für Standard-Sequenzierungen

pET-Promotor	CGAAATTAATACGACTCACTATAGG
pET-Terminator	TATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTG
pK19 <i>mobsacB</i> -fw	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCAC
pK19 <i>mobsacB</i> -rv	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
pEKEx2-fw	CGGCGTTTCACTTCTGAGTTGCGC
pEKEx2-rv	GATATGACCATGATTACGCCAAGC
Seq1-MSMEG_6856-fw	GATGGGCAAGCGGATGCAAC
Seq2-MSMEG_6856-rv	GATGGGCAAGCGGATGCAAC
Seq1-MSMEG_6645-fw	GGCAGGCTCTGCACCTGACG
Seq2-MSMEG_6645-rv	GCAGCGGAACCTGGTAGGTG
Seq1- <i>prpD1</i> -fw	GGCACGTTGTTGCATGTAGATG
Seq2- <i>prpD1</i> -rv	CCGTGTTCCGGCAATGGCAC
Seq1- <i>icd</i> -up-fw	CCACCTCCGAAGGCGAACTTG
Seq2- <i>icd</i> -dn-rv	GCAGTTCTGGGATGTCGTAGCC
Seq1- <i>aco1/aco2/aco3</i> -fw	CTGCACAAGTACCGCACCCCTG
Seq2- <i>aco1/aco2</i> -fw-2	GCACCAAAGGTGATCGGCGTG
Seq3- <i>aco1/aco2</i> -fw-3	GGTCGCAACGATGCAAACCCAG
Seq4- <i>aco1/aco2</i> -rv-1	GCCATGGGCCTGCCATGGAG
Seq5- <i>aco1/aco2</i> -rv-2	CTGCGCCTTCATCTTCGCGCAG
Seq6- <i>aco1/aco2</i> -rv-3	GATGTTGTACTTTGCGGTTGCGG
Seq7- <i>aco3</i> -fw-2	GCACCAGGCCTGATGATGCTG
Seq8- <i>aco3</i> -fw-3	GGATCGCGATCAGACCTGTC
Seq9- <i>aco3</i> -fw-4	CCAGCCACGCTACCTGGGTG
Seq10- <i>aco3</i> -fw-5	GGCAAACAACGTGACCTCCGATG
Seq11- <i>aco3</i> -rv-2	GGGATGGAGATGATTGGCACGG
Seq12- <i>aco3</i> -rv-3	GCCTGCTGCGGAGATGGTATC
Seq13- <i>aco3</i> -rv-4	CGTGGTATTCGATCACGAAGCC
Seq1- Δ <i>acn</i> -fw	CCATTGCCACGGCATCATCAC
Seq2- Δ <i>acn</i> -rv	GACGACGCGAGCCAAGTACTC
Seq3- Δ <i>acn::aco1/aco2</i> -rv	CCACCCACGCCGATTGCTGC
Seq4- Δ <i>acn::aco3</i> -rv	CCAGCATCATCAGGCCTGGTG
Seq1- Δ <i>ldh</i> -fw	CCACGGCGGTAAAAACCTCTC
Seq2- Δ <i>ldh</i> -rv	GCCGGTGCGTACTTTTGGTCC
Seq3- Δ <i>ldh::ATEG_09970</i> -rv	GACCAACCGCAGAGAAGAATCC
Seq3- Δ <i>ldh::ATEG_09972</i> -rv	ACGCCAACTCGTGAAAGTGACG
Seq1- <i>cad</i> -mid-rv	GAGATGGTCTTGCCCTGTTCTG

4 Plasmide

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete und konstruierte Plasmide.

Name	Eigenschaften	Referenz
pET16b	Amp ^R ; P _{T7} , <i>lacI</i> , <i>oriV</i> aus pBR322, Vektor zur IPTG-induzierbaren Überexpression von Genen in <i>E. coli</i> , der das Anfügen eines N-terminalen „Tags“ aus 10 Histidin-Resten ermöglicht.	Novagen
pEKEx2	Kan ^R ; P _{tacl} , <i>lacI</i> ^q , pBL1 <i>oriV</i> _{C.g.} , pUC18 <i>oriV</i> _{E.c.} <i>C. glutamicum</i> / <i>E. coli</i> Shuttle-Vektor für regulierte Genexpression.	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991
pK19mobsacB	Kan ^R , pK18 <i>oriV</i> _{E.c.} , <i>sacB lacZα</i> ; Vektor für allelischen Austausch in <i>C. glutamicum</i> .	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pET-TEV1	Kan ^R ; pET28b-Derivat zur Überexpression von Genen in <i>E. coli</i> ; fügt dem Zielprotein am N-terminalen Ende einen Decahistidin-Tag und eine TEV-Protease Schnittstelle an. (pBR322 <i>oriV</i> _{E.c.} , P _{T7} , <i>lacI</i>).	Bussmann <i>et al.</i> , 2010
pMAL-c	Amp ^R , Expressionsvektor zur Fusion eines Proteins an das Maltose-Bindeprotein MalE aus <i>E. coli</i> ohne dessen Signalpeptid.	New England Biolabs
pEKEx2- <i>cad</i> _{opt}	Kan ^R , pEKEx2-Derivat zur Expression des Codon-Usage- <u>optimierten</u> <i>cad</i> -Gens aus <i>A. terreus</i> in <i>C. glutamicum</i> .	Diese Arbeit
pEKEx2- <i>cad</i> _{opt2}	Kan ^R , pEKEx2-Derivat, das die Klonierung eines zweiten Gens downstream des <i>cad</i> -Gens in die Schnittstellen SacI, BamHI, Acc65I, KpnI und EcoRI ermöglicht.	Diese Arbeit
pEKEx2- <i>cad</i> _{opt} - <i>prpD2</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat zur Überproduktion der Proteine CAD aus <i>A. terreus</i> und PrpD2 aus <i>C. glutamicum</i> .	Diese Arbeit
pEKEx2- <i>cad</i> _{opt} - <i>aco1</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat zur Überproduktion der Proteine CAD und Aco (Aco1) aus <i>A. terreus</i> .	Diese Arbeit
pEKEx2- <i>cad</i> _{opt} - <i>aco2</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat zur Überproduktion der Proteine CAD und ATEG_03325 (Aco2) aus <i>A. terreus</i> .	Diese Arbeit
pEKEx2- <i>cad</i> _{opt} - <i>aco3</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat zur Überproduktion der Proteine CAD und ATEG_02937 (Aco3) aus <i>A. terreus</i> .	Diese Arbeit
pEKEx2- <i>cad</i> _{opt} -ATEG_09970	Kan ^R , pEKEx2-Derivat zur Überproduktion der Proteine CAD und ATEG_09970 aus <i>A. terreus</i> .	Diese Arbeit
pEKEx2- <i>cad</i> _{opt} -ATEG_09972	Kan ^R , pEKEx2-Derivat zur Überproduktion der Proteine CAD und ATEG_09972 aus <i>A. terreus</i> .	Diese Arbeit

Name	Eigenschaften	Referenz
pEKEx2- <i>cad_{nat}</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat zur heterologen Überproduktion des CAD-Proteins mit <u>nativer</u> Gensequenz aus <i>A. terreus</i> in <i>C. glutamicum</i> .	Diese Arbeit
pEKEx2- <i>malE</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat, das die Fusion eines Proteins an das Maltose-Bindeprotein MalE aus <i>E. coli</i> ohne dessen Signal-Peptid erlaubt.	Diese Arbeit
pEKEx2- <i>malEcad_{opt}</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat zur Überproduktion des Fusions-Proteins MalE-Cad.	Diese Arbeit
pET-TEV1- <i>prpD1</i>	Kan ^R , pET-TEV1-Derivat zur Überproduktion und anschließenden Reinigung von N-His ₁₀ -PrpD1.	Diese Arbeit
pET-TEV1- <i>prpD2</i>	Kan ^R , pET-TEV1-Derivat zur Überproduktion und anschließenden Reinigung von N-His ₁₀ -PrpD2.	Baumgart (unveröffentlicht)
pET-TEV1-MSMEG_6645	Kan ^R , pET-TEV1-Derivat zur Überproduktion und anschließenden Reinigung von N-His ₁₀ -MSMEG_6645, der putativen 2-Methylcitrat-Dehydratase aus <i>Mycobacterium smegmatis</i> .	Diese Arbeit
pET16b-MSMEG_6856	Amp ^R , pET-16b-Derivat zur Überproduktion und anschließenden Reinigung von N-His ₁₀ -MSMEG_6856, dem putativen CAD-Homolog aus <i>Mycobacterium smegmatis</i> .	Diese Arbeit
pEKEx2-MSMEG_6856	Kan ^R , pEKEx2-Derivat zur heterologen Überproduktion von MSMEG_6856 in <i>C. glutamicum</i> .	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> <i>Δacn::aco1</i>	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat zur Integration des heterologen <i>aco1</i> -Gens aus <i>A. terreus</i> in die <i>acn</i> -codierende Region aus <i>C. glutamicum</i> .	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> <i>Δacn::aco2</i>	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat zur Integration des heterologen <i>aco2</i> -Gens aus <i>A. terreus</i> in die <i>acn</i> -codierende Region aus <i>C. glutamicum</i> .	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> <i>Δacn::aco3</i>	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat zur Integration des heterologen <i>aco3</i> -Gens aus <i>A. terreus</i> in die <i>acn</i> -codierende Region aus <i>C. glutamicum</i> .	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB-icd</i>	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat, das einen Teil der <i>icd</i> codierenden Region enthält.	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB-icd</i> (A1G)	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat zum chromosomalen Austausch des <i>icd</i> -Startcodons (ATG) gegen ein GTG.	Diese Arbeit

Name	Eigenschaften	Referenz
pK19 <i>mobsacB-icd</i> (A1T)	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat zum chromosomalen Austausch des <i>icd</i> -Startcodons (ATG) gegen ein TTG.	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB-Δldh::</i> ATEG_09970	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat zum chromosomalen Austausch des <i>ldh</i> -Gens aus <i>C. glutamicum</i> gegen das heterologe Gen ATEG_09970 aus <i>A. terreus</i> .	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB-Δldh::</i> ATEG_09972	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat zum chromosomalen Austausch des <i>ldh</i> -Gens aus <i>C. glutamicum</i> gegen das heterologe Gen ATEG_09972 aus <i>A. terreus</i> .	Diese Arbeit
pMK-RQ- <i>cad</i> _{opt}	Kan ^R , ColE1 origin, enthält das Gen <i>cad1</i> aus <i>A. terreus</i> mit einer für <i>C. glutamicum</i> optimierten Codon-Usage (siehe Anhang 1).	Geneart
pMK-RQ- <i>cad</i> _{nat}	Kan ^R , ColE1 origin, enthält das Gen <i>cad1</i> aus <i>A. terreus</i> mit nativer Gensequenz.	Geneart
pMK-RQ- <i>aco1</i>	Kan ^R , ColE1 origin, enthält das putative Aconitase-Gen <i>aco</i> aus <i>A. terreus</i> .	Geneart
pMK-RQ- <i>aco2</i>	Kan ^R , ColE1 origin, enthält das putative Aconitase-Gen ATEG_03325 aus <i>A. terreus</i> .	Geneart
pMK-RQ- <i>aco3</i>	Kan ^R , ColE1 origin, enthält das putative Aconitase-Gen ATEG_02937 aus <i>A. terreus</i> .	Geneart
pMK-RQ-ATEG_09970	Kan ^R , ColE1 origin, enthält das Gen ATEG_09970, das für einen putativen Itaconsäure-Transporter codiert.	Geneart
pMK-RQ-ATEG_09972	Kan ^R , ColE1 origin, enthält das Gen ATEG_09972, das für einen putativen Itaconsäure-Transporter codiert.	Geneart

5 Organismen

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtypstamm, Biotin-auxotroph	(Abe <i>et al.</i> , 1967)

Stamm	Eigenschaften	Referenz
ATCC 13032- <i>icd</i> (A1G)	Derivat von ATCC 13032, enthält einen Austausch des nativen ATG-Startcodons des <i>icd</i> -Gens (cg0766) zu einem GTG	Diese Arbeit
ATCC 13032- <i>icd</i> (A1T)	Derivat von ATCC 13032, enthält einen Austausch Des nativen ATG-Startcodons des <i>icd</i> -Gens (cg0766) zu einem TTG	Diese Arbeit
ATCC 13032 Δ <i>icd</i>	Derivat von ATCC 13032, enthält eine „in-frame“-Deletion des <i>icd</i> -Gens (cg0766)	Baumgart <i>et al.</i> , 2011
ATCC 13032 Δ <i>acn::aco1</i>	Derivat von ATCC 13032, enthält eine „in frame“-Integration des putativen Aconitase-Gens <i>aco1</i> aus <i>Aspergillus terreus</i> in die Genregion des <i>C. glutamicum acn</i> -Gens (cg1737)	Diese Arbeit
ATCC 13032 Δ <i>acn::aco2</i>	Derivat von ATCC 13032, enthält eine „in frame“-Integration des putativen Aconitase-Gens <i>aco2</i> aus <i>Aspergillus terreus</i> in die Genregion des <i>C. glutamicum acn</i> -Gens (cg1737)	Diese Arbeit
<i>E. coli</i>:		
DH5 α	F ⁻ <i>thi-1 hsdR17 supE44 Δlac U169</i> (ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15) <i>recA1 endA1 gyrA96 relA1</i> ; Stamm für Klonierungen und Plasmidpräparationen	Bethesda Research Laboratories
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B- m_B-) gal dcm</i> (λ clts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1</i>); Wirtsstamm für die Überproduktion der pET-kodierten rekombinanten Proteine; enthält den lysogenen Phagen λ DE3, der das T7-Phagen-RNA-Polymerase-Gen unter der Kontrolle des <i>lacUV5</i> -Promotors trägt.	Novagen

6 Stammhaltung von Bakterien

Zur Stammhaltung wurden Bakterien 14-16 h in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium (*E. coli*) bzw. 5 ml BHIS-Medium (*C. glutamicum*) mit 170 Upm bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 30 °C (*C. glutamicum*) kultiviert. Die Zellen wurden anschließend geerntet, in 1,5 ml frischem Medium resuspendiert, mit 1,5 ml sterilem Glycerin (100%) gemischt und in zwei Aliquots aufgeteilt. Beide Aliquots wurden bei -70 °C gelagert.

7 Kultivierung von Bakterienstämmen

7.1 Kultivierung von *E. coli*

Alle *E. coli* Stämme wurden in Reagenzgläsern, Schüttelkolben oder auf Agarplatten bei 37 °C kultiviert. Standardmäßig wurde dazu LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 1,5% (w/v) Agar zugesetzt. Zur selektiven Kultivierung antibiotikaresistenter *E. coli* Stämme, wurde dem Medium die entsprechende Konzentration des Antibiotikums zugesetzt (50 µg ml⁻¹ Kanamycin; 100 µg ml⁻¹ Ampicillin). Zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurden diese in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum 14-16 h bei 170 Upm geschüttelt.

7.2 Expressionskulturen

Zur Überproduktion heterologer Proteine in *E. coli* wurde standardmäßig der Stamm *E. coli* BL21(DE3) verwendet. Dazu wurde eine ÜN-Kultur des *E. coli* Stammes mit dem entsprechenden Expressionsplasmid angelegt. 1 l LB-Medium mit 100 µg ml⁻¹ Ampicillin bzw. 50 µg ml⁻¹ Kanamycin wurden in einem 2-l Schüttelkolben mit zwei seitlichen Schikanen anschließend auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert. Die Kulturen wurden zunächst bei 37 °C und 120 Upm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,7 erreicht war. Die Expression des Zielgens wurde dann mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Zur anschließenden Expression wurden die Kulturen bei RT für 4 Stunden weiter kultiviert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (20 min, 8600 g, 4 °C), wobei die Zellen einmal in 20 ml Aufschlusspuffer gewaschen und anschließend bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert wurden. Vor Induktion sowie 1, 2, 3 und 4 Stunden danach, wurde die OD₆₀₀ bestimmt, sowie 150 µl Proben entnommen und abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in (OD₆₀₀ × 30) µl 1 x SDS-Ladepuffer aufgenommen und bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -20 °C gelagert.

7.3 Kultivierung von *C. glutamicum*

C. glutamicum wurde standardmäßig in 500-ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen kultiviert, die 60 ml mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose (222 mM) enthielten und bei 30 °C und 120 Upm inkubiert wurden. Zum Inokulieren der Vorkulturen wurden Einzelkolonien von Agarplatten verwendet, die nicht älter als 3 Tage waren. Die Vorkultivierung erfolgte zunächst für 8 h in 5 ml BHIS-Medium und anschließend für 16 h in

60 ml mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose. Die darauffolgende 60-ml-Hauptkultur wurde zu einer OD_{600} von 1 inokuliert. Für die Limitierung des Stickstoffgehalts im mCGXII-Minimalmedium wurde die Stickstoffquelle auf 1 g l^{-1} Harnstoff reduziert. Alternativ wurde für die Fermentation auch $2,2 \text{ g l}^{-1}$ Ammoniumsulfat verwendet. Für die Kultivierung im Bioreaktor (Multifors Multi-Fermenter System mit sechs unabhängig steuerbaren Bioreaktoren, Infors Einsbach, Deutschland) wurden die beiden Vorkulturen wie bereits beschrieben gehandhabt. Jeder 1,4-l Bioreaktor wurde mit 600 ml mCGXII-Medium mit 4% (w/v) Glucose, jedoch ohne MOPS, gefüllt und auf eine OD_{600} von 1 angeimpft. Der Reaktor wurde mit $0,9 \text{ l min}^{-1}$ Luft begast. Die Sauerstoffsättigung wurde mit einer polarimetrischen Sauerstoffelektrode (Mettler Toledo, Giessen, Deutschland) überprüft und durch Regulierung des Rührers zwischen 600 Upm und 1000 Upm auf über 30% gehalten. Während der Kultivierung wurde der pH-Wert mit einer pH-Elektrode (Mettler Toledo) überprüft und gegebenenfalls durch Zugabe von 3 M KOH bzw. 3 M HCl auf pH 7 reguliert. Schaumbildung wurde durch Titration von 25% (v/v) Antifoam 204/water suspension (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) auf ein Minimum reduziert.

8 Bestimmung von Wachstums- und Stoffwechselparametern

8.1 Bestimmung des Wachstums von Bakterien-Kulturen

Das Wachstumsverhalten von Bakterien in Flüssigkultur wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Photometer (Ultrospec 500 pro Visible Spectrophotometer, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) verfolgt. Die lineare Abhängigkeit zwischen Zelldichte und der optischen Dichte war bei Extinktionen bis 0,4 gegeben. Bei höheren Werten wurde die Probe mit Wasser (bei mCGXII-Minimalmedium) oder dem Kulturmedium (bei LB-Medium) verdünnt.

8.2 Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert von Medien und Proben wurde mit einem pH-Meter (Labor-pH-Meter 766 Calimatic, Knick, Berlin) bestimmt. Alle Proben wurden zunächst 10 min bei 16100 g zentrifugiert und daraufhin im Überstand gemessen. Die Kalibrierung des Geräts erfolgte mit Kalibrierlösungen von pH 4 und pH 7 bzw. pH 7 und pH 9.

8.3 Bestimmung organischer Säuren und von Glucose im Kultivierungsüberstand mittels HPLC

Die qualitative und quantitative Bestimmung von organischen Säuren und Glucose in Kulturüberständen erfolgte mit Hilfe des Agilent Technologies 1100 LC Systems (Agilent Technologies, Böblingen). Durch isokratische Elution innerhalb von 38 min mit 100 mM H_2SO_4 bei einer Flussrate von $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ und einer Temperatur von 40°C wurden die organischen Säuren an einer Kationenaustauschersäule (Organic acid resin, aus Polystyrol-divinylbenzol-Copolymer (PS-DVB), $300 \times 8 \text{ mm}$; CS-Chromatographie GmbH, Langerwehe) und vorgeschalteter Vorsäule ($40 \times 8 \text{ mm}$) mit gleichem Säulenmaterial, aufgetrennt. Die eluierten organischen Säuren wurden mit dem Agilent 1100 Dioden-Array-Detektor bei einer Wellenlänge von 215 nm detektiert, die Glucose mit einem Agilent 1100 Refractive Index-Detektor. Die Quantifizierung der organischen Säuren erfolgte durch Vergleich der Integrationsflächen mit zuvor erstellten Kalibriergeraden aus externen Standards der entsprechenden Säuren und Zucker in wässriger Lösung.

8.4 Qualitative und quantitative Itaconat-Bestimmung

Zur qualitativen und quantitativen Itaconat-Bestimmung wurden verschiedene Itaconat-Konzentrationen in wässrigem Medium wie unter 8.3 beschrieben aufgetrennt. Die Standardreihe ist in Abbildung 4 dargestellt. Abbildung 4A zeigt, dass Itaconat qualitativ über die verwendete HPLC-Methode nachgewiesen werden kann. Der lineare Messbereich und somit die quantitative Nachweismöglichkeit erstreckt sich von $0,01 \text{ mM}$ bis $1,75 \text{ mM}$, wie Abbildung 4B zeigt. Zusätzlich wurden die Retentionszeiten der Biosynthesevorstufen von Itaconat bestimmt. Dazu wurde ein Standardgemisch genutzt, das 10 mM Citrat, 10 mM Isocitrat, 1 mM Itaconat und je 1 mM *cis*-Aconitat und *trans*-Aconitat enthielt. Die Retentionszeiten sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Mit Ausnahme des Stereoisomerenpaares Citrat und Isocitrat weisen alle gemessenen Substanzen unterschiedliche Retentionszeiten auf und können somit mit Hilfe von HPLC aufgetrennt und unterschieden werden.

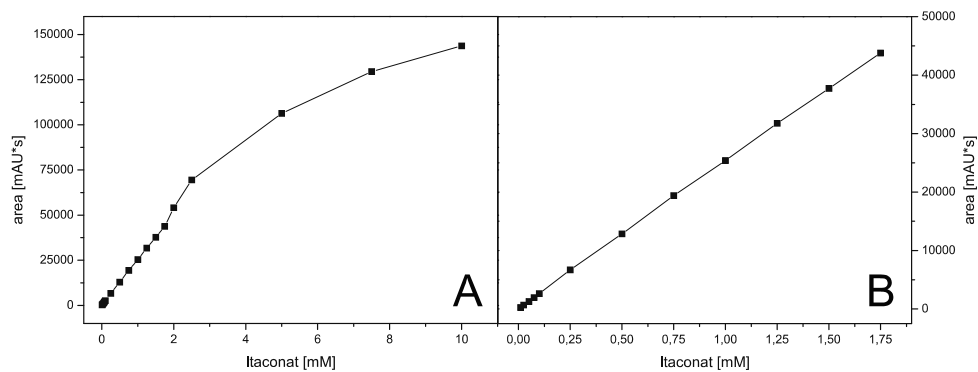


Abbildung 4: Standardgeraden für den qualitativen und quantitativen Nachweis von Itaconat mittels HPLC. Genutzt wurden folgende Itaconat-Konzentrationen: 0,01 mM, 0,025 mM, 0,05 mM, 0,075 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM, 1,25 mM, 1,5 mM, 1,75 mM, 2 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM und 10 mM. In B ist der lineare Messbereich vergrößert dargestellt.

Tabelle 6: Retentionszeiten der Substanzen Citrat, Isocitrat, *cis*-Aconitat, *trans*-Aconitat und Itaconat bei der Analyse mittels HPLC.

Substanz	Retentionszeit (min)
Citrat / Isocitrat	14,37
<i>cis</i> -Aconitat	15,74
<i>trans</i> -Aconitat	19,85
Itaconat	24,63

8.5 Bestimmung intrazellulärer Metabolite mittels HPLC

Zur quantitativen Bestimmung organischer Säuren innerhalb der Zelle wurden die Produktionsstämme wie beschrieben kultiviert und zum gewünschten Zeitpunkt 1 ml Zellsuspension (bis maximal OD₆₀₀ 80) geerntet, indem sie in ein am Vortag präpariertes 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und 1 min bei 13000 g zentrifugiert wurde. Dieses Reaktionsgefäß enthielt 300 µl 20% (v/v) HClO₄ ($\delta = 1,18 \text{ g cm}^{-3}$) und 500 mg Silikonöl ($\delta = 1,075 \text{ g/cm}^3$), wurde durch kurzes Anzentrifugieren (13000 g bei RT) entgast und bei -20 °C gelagert. Bei der Zentrifugation der Zellsuspension wurde das Medium von den Zellen getrennt: das Medium mit den darin enthaltenen Metaboliten verblieb über der Silikonöl-Phase, während die Zellen durch das Silikonöl in die untere HClO₄-Phase zentrifugiert wurden. Durch die Perchlorsäurephase wurde der Stoffwechsel gestoppt, die Zellen lysiert und die intrazellulären Metabolite freigesetzt. Nach Abnehmen der oberen wässrigen Phase (= extrazelluläre Metabolite) konnten Silikonphase und HClO₄-Phase durch

Vortexen gemixt werden. Durch Neutralisation mit 190 μl 6 M KOH wurde die homogene Emulsion neutralisiert und entsalzt. Nach 5 min Inkubation auf Eis und 5-minütiger Zentrifugation (13000 g , 4 $^{\circ}\text{C}$) wurde das Salz vollständig aus dem System entfernt. Die intrazellulären Metabolite befinden sich nun in der wässrigen, neutralisierten oberen Phase und konnten bis zur Analyse bei -20 $^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Die intrazellulären Metabolite wurden wie in 8.3 und 8.4 beschrieben identifiziert und quantifiziert.

8.6 Bestimmung organischer Säuren mittels GC-TOF-MS

Für die qualitative Bestimmung organischer Säuren mittels GC-TOF-MS wurde 1 ml Zellsuspension mit einer OD_{600} von 20 geerntet (5000 g , 3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$). Nach Waschen mit 2,7% (w/v) NaCl und erneuter Zentrifugation (5000 g , 3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) wurde das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Aufschluss bei -20 $^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 ml 100% Methanol und 30 minütiger Inkubation im Ultraschallbad bei 65 $^{\circ}\text{C}$. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (13000 g , 5 min, RT) entfernt. 130 μl des Überstands wurden abgenommen, in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend über Nacht lyophilisiert. Die getrocknete Probe wurde anschließend mit 60 μl Methoxyamin-HCl in Pyridin (20 mg ml^{-1}) derivatisiert. Dazu wurde die Probe 90 min bei 35 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert, mit 80 μl MSTFA (*N*-acetyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid) gemischt und anschließend weitere 30 min bei 35 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. 1 μl der derivatisierten Probe wurde anschließend vermessen. Für die Bestimmung der derivatisierten Metabolite wurde ein Agilent 6890N Gaschromatograph genutzt, der an ein hochauflösendes Waters Micromass GCT Premier MS-TOF Massenspektrometer gekoppelt war. Das System wurde mit der Waters MassLynx 4.1 Software gesteuert. Der Gaschromatograph war mit einer 30 m Varian FactorFour VF-5ms + 10 m Vorsäule ausgestattet. Ein konstanter Heliumfluss von 1 ml min^{-1} wurde genutzt. Das GC Temperaturprogramm startete bei 60 $^{\circ}\text{C}$ und wurde nach einer 2 minütigen Inkubation um 12 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ erhöht, bis eine Temperatur von 300 $^{\circ}\text{C}$ erreicht wurde. Die finale Temperatur wurde für 8 min gehalten. Das ToF-MS operierte im $[\text{EI}]^{+}$ Modus mit einer Energie von 70 eV. Die Temperatur der Ionisierungsquelle betrug 180 $^{\circ}\text{C}$. Das MS wurde mit dem Fragmentierungsmuster von Heptacosan (Heptacosafuorotributylamin) kalibriert. Die erhaltenen Massen wurden mit CPF₅B (Chloro-Pentafluor-Benzen) als externem Standard mit 201.9609 m/z korrigiert. Die Datenaufnahme erfolgte mit einer Rate von 10 scans s^{-1} . Die

Identifizierung bekannter Metabolite erfolgte per Vergleich mit der hauseigenen Datenbank JuPoD, der kommerziellen Datenbank NIST08, National Institute of Standards and Technology, USA und der frei erhältlichen Datenbank GMD, MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm.

9 Molekularbiologische Methoden

9.1 Herstellung und Transformation elektrokompeter *C. glutamicum*-Zellen

Die Herstellung und Transformation von kompetenten *C. glutamicum*-Zellen erfolgte nach der Methode von van der Rest *et al.* (1999). Von einer frisch ausgestrichenen BHIS-Agarplatte wurde eine 50 ml BHIS Vorkultur mit einer Einzelkolonie angeimpft und 16 h bei 30 °C kultiviert. Eine 500 ml BHIS-Hauptkultur wurde damit auf eine OD₆₀₀ von 0,4 inokuliert. Bei einer OD₆₀₀ von 1,75-2 wurden die Zellen zunächst für 20 min auf Eis gelagert, bevor sie geerntet wurden. Die Zellen wurden je zweimal mit 20 ml TG-Puffer und 10%-igem (v/v) Glycerin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml 10%-igem (v/v) Glycerin resuspendiert und in 100 µl Aliquots bei -70 °C gelagert.

Die Transformation der kompetenten *C. glutamicum*-Zellen wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Dazu wurden 100 µl kompetente Zellen mit etwa 100 ng Plasmid (1-2 µg bei gewünschter Insertion ins Genom) in einer eisgekühlten Elektroporationskuvette gemischt. Die Zellen wurden dann mit 700 µl eiskaltem 10%-igem (v/v) Glycerin überschichtet. Die Elektroporation (Gene Pulser, BioRad, München) erfolgte mit einer Kapazität von 25 µF, einem Widerstand von 200 Ω und einer Spannung von 2,5 kV. Im Anschluss an die Elektroporation wurden die Zellen in 4 ml BHIS-Medium (auf 46 °C vorgewärmt) suspendiert, einem Hitzeschock unterzogen (6 min bei 46 °C) und abschließend 1 h bei 30 °C inkubiert.

9.2 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte analog zu der Methode von Hanahan (Hanahan, 1985). Statt SOC-Medium wurde LB-Medium bei der Kultivierung verwendet. Zur Regeneration nach dem Hitzeschock wurde SOC-Medium verwendet. Von einer frisch ausgestrichenen LB-Agarplatte wurde eine 50 ml LB-Vorkultur mit einer Einzelkolonie angeimpft und 16 h bei 30 °C kultiviert. Eine 50 ml Hauptkultur wurde anschließend auf eine

OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,5 bei 37 °C und 160 Upm inkubiert. Danach wurden die Zellen in 50 ml Falcontubes überführt und 15 min auf Eis abgekühlt. Auch alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden 15 min bei 5467 g und 4 °C geerntet, in 1/3 Kulturvolumen eiskalter RF1-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 1/12,5 Kulturvolumen eiskalter RF2-Lösung resuspendiert, nochmals 15 min auf Eis inkubiert und in 100 µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Zellen wurden bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

RF1-Lösung

RbCl ₂	100 mM
MnCl ₂ 4H ₂ O	50 mM
K-Acetat	30 mM
CaCl ₂ 2H ₂ O	10 mM
Glycerin	15% (v/v)
mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8	

RF2-Lösung

Morpholinopropansulfonsäure	10 mM
RbCl ₂	10 mM
CaCl ₂ 2H ₂ O	75 mM
Glycerin	15% (v/v)
mit 6 M NaOH auf pH 6,8	

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 100 µl der Zellen mit bis zu 5 µl Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 s bei 42 °C wurden 700 µl LB-Medium (auf 37 °C erwärmt) zugegeben und der Ansatz für weitere 60 min unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Entsprechend dem Antibiotikaresistenzgen des transferierten Plasmids wurden 20 µl und 100 µl des Ansatzes auf LB-Platten mit 50 µg ml⁻¹ Kanamycin oder 100 µg ml⁻¹ Ampicillin ausplattiert.

9.3 Integration von Genen und Einführung chromosomaler Mutationen mit Hilfe des pK19mobsacB-Systems

Für die Integration der Gene *aco1*, *aco2*, und *aco3* aus *A. terreus* sowie für den Austausch des Startcodons des *icd*-Gens aus *C. glutamicum* wurde das von Niebisch und Bott (Niebisch und Bott, 2001) beschriebene System zur „in-frame“ Deletion von Genen in *C. glutamicum*, das an die von Link (Link *et al.*, 1997) beschriebene Methode angelehnt ist, genutzt. Für die Integration der putativen Aconitasegene *aco1*, *aco2* und *aco3* wurden die von Life Technologies synthetisierten Gene mit den *acn* flankierenden Bereichen (je ca.

600 Basenpaare) in den Vektor pK19*mobsacB* kloniert. Bei der Integration der putativen Itaconsäure-Transporter ATEG_09970 und ATEG_09972 wurde analog vorgegangen. Diese Gene wurden mit flankierenden Sequenzen des *ldh*-Gens synthetisiert und auf den Plasmiden pMK-RQ-ATEG_09970 und pMK-RQ-ATEG_09972 geliefert.

Für den Austausch des Startcodons des *icd*-Gens wurde mit den Oligonukleotiden P1-*icd*-fw und P2-*icd*-rv zunächst ein Fragment amplifiziert, das die flankierenden Bereiche (ca. 550 bp) upstream und downstream vom *icd*-Startcodon enthält und in den Vektor pK19*mobsacB* ligiert. Anschließend wurden die Mutationen des Startcodons mit dem QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) nach Angaben des Herstellers eingeführt. Dazu wurden die Oligonukleotide P3-*icd*-fw und P4-*icd*-rv (für GTG) bzw. P5-*icd*-fw und P6-*icd*-rv (für TTG) verwendet. Die konstruierten Plasmide wurden durch Sequenzierung auf Fehler überprüft und anschließend mittels Elektroporation in *C. glutamicum* transferiert und auf BHIS-Nährböden mit 25 µg ml⁻¹ Kanamycin ausplattiert. Da der Vektor pK19*mobsacB* in *C. glutamicum* nicht repliziert wird, können kanamycinresistente Klone nur durch homologe Rekombination des Plasmids in das Chromosom auftreten. Zur Selektion auf ein zweites Rekombinationsereignis wurden kanamycinresistente Klone zunächst über Tag in 5 ml BHIS-Medium ohne Kanamycin kultiviert und anschließend jeweils 100 µl einer 1:10-, 1:100- und 1:500-Verdünnung der Kulturen auf BHIS-Nährböden mit 10% (w/v) Saccharose ausplattiert. Das *sacB*-Gen des pK19*mobsacB*-Plasmids kodiert für das Enzym Levansucrase, das Saccharose in ihre Monosaccharide Fructose und Glucose spaltet und Fructose zu oligomerem Levan umsetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die *sacB*-Expression in Anwesenheit von Saccharose letal für *C. glutamicum* ist (Jäger *et al.*, 1992). Daher sollte bei saccharoseresistenten Klonen das Plasmid durch ein weiteres Rekombinationsereignis wieder aus dem Chromosom entfernt worden sein. Bei diesem zweiten Rekombinationsereignis kann entweder die Wildtyp-Situation wiederhergestellt oder die gewünschte Deletion erzeugt werden. Klone, die sowohl saccharoseresistent als auch kanamycinsensitiv waren, wurden durch Kolonie-PCR bzw. Sequenzierung mit passenden Sequenzierprimern (Tab. 3) analysiert.

10 DNA-Techniken

10.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) wurde nach Angaben des Herstellers zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* verwendet. Zur Generierung von genügend Zellmaterial wurden 5 ml LB-Medium mit einem Klon einer einzelnen *E. coli* Kolonie, der das entsprechende Plasmid trug, inokuliert und 16 h bei 37 °C und 170 Upm inkubiert. Die Elution des Plasmids von der Säule erfolgte mit 50 µl bidest. H₂O.

10.2 Isolierung von genomischer DNA aus *C. glutamicum*

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* wurden Zellen einer 5 ml Übernachtskultur vollständig sedimentiert, in 400 µl Lysispuffer (20 mM Tris-HCl, 2 mM Na₂EDTA, 1,2% (v/v) Triton X-100, pH 8,0) mit 20 mg ml⁻¹ Lysozym (frisch zugesetzt) resuspendiert und 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden 80 µl 10% (w/v) SDS und 25 µl Proteinase K (20 mg ml⁻¹ in TE-Puffer) zugegeben, kurz gevortext und 30 min bei 70 °C inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1; pH 7,5-8,0) und vortexen wurden die Phasen durch 3 min Zentrifugation bei 16100 g getrennt, die obere wässrige Phase abgenommen, mit 1 ml eiskaltem abs. Ethanol versetzt, gevortext und 10 min mit 16100 g bei 4 °C zentrifugiert. Das präzipitierte DNA-Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, der Ethanol vollständig abgenommen, die DNA luftgetrocknet und in 250 µl bidest. H₂O gelöst.

10.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das MiniElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Elution von der Säule erfolgte mit 10 µl bidest. H₂O.

10.4 PCR-Purification-Kit

Zur Reinigung von PCR-Produkten bzw. restringierten PCR-Produkten von Nukleotiden, Oligonukleotiden und Restriktionsenzymen wurde das QIAquick PCR-Purification-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die gereinigte DNA wurde mit 50 µl bidest. H₂O von der Säule eluiert.

10.5 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch die Messung der Extinktion bei 260 nm (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Dazu wurde 1 µl der Probe zwischen zwei optische Fasern pipettiert. Die Reinheit der DNA wurde anhand des Quotienten OD_{260}/OD_{280} bestimmt, wobei der Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Niedrigere oder höhere Quotienten lassen auf Verunreinigungen mit Protein, Phenol oder anderen Kontaminanten schließen, die ebenfalls bei 280 nm eine hohe Absorption aufweisen.

Es wurde mit folgenden Umrechnungsfaktoren gearbeitet (Sambrook 1989):

doppelsträngige DNA: $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von $50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$

10.6 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennungen von DNA-Fragmenten für analytische und präparative Zwecke erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Für die Gele wurde 0,8 bis 2%-ige (w/v) UltraPure™ Agarose (Invitrogen, Darmstadt) in 1 x TAE-Puffer verwendet, der gleichzeitig auch als Elektrophorese-Puffer diente. Die Auftrennung erfolgte mit einer Spannung zwischen 80 und 120 V. Die Anfärbung der DNA erfolgte durch mindestens 30-minütige Inkubation des Gels in wässriger Gel-Red-Lösung (1:10000). Durch Belichtung mit UV-Licht wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einem Image Master VDS System (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg). Zur Größenbestimmung der DNA wurde der DNA-Längenstandard GeneRuler™ 1 kb DNA ladder ready-to-use¹ von Fermentas (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

10.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Sowohl für analytische (Kontrolle transformierter Klone), als auch für präparative Zwecke (*in vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten) wurde die PCR (Mullis und Faloona, 1987) genutzt. Für analytische Zwecke wurde die Taq DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur *in vitro* Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde die KOD-Hot Start-DNA-Polymerase (Novagen) genutzt. Die PCR wurde standardmäßig im

¹ Der DNA-Längenstandard GeneRuler™ 1 kb DNA ladder ready-to-use enthält Fragmente folgender Größen: 250 bp, 500 bp, 750 bp, 1000 bp, 1500 bp, 2000 bp, 2500 bp, 3000 bp, 3500 bp, 4000 bp, 5000 bp, 6000 bp, 8000 bp und 10000 bp

Mastercycler epgradient (Eppendorf) durchgeführt. Als Reaktionsbedingungen wurden folgende Parameter genutzt:

Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 50 µl. Zu 100 bis 200 ng Matrizen-DNA wurden je 15 pmol beider Oligonukleotide, 1 µl KOD-Hot Start-DNA-Polymerase, 5 µl 10 x Puffer, sowie 2 µl dNTPs (10 mM Stocklösung) pipettiert. Die PCR wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

10 min 95 °C	Denaturieren
30 s 95 °C	Denaturieren
30 s $T_m - 5$ °C	„Annealing“
60 s/1000 bp 72 °C	Elongation

Die Schmelztemperatur der DNA wurde mit folgender Formel abgeschätzt:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = [(G+C) \times 4] + [(A+T) \times 2]$$

Die erhaltenen PCR Fragmente wurden mit Hilfe des QIAquick PCR-Purification-Kits (Qiagen, Hilden) gereinigt.

10.8 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde zur Überprüfung von *E. coli* und *C. glutamicum* Transformanden verwendet. Zellen einer Einzelkolonie wurden dafür mit einer Pipette direkt in den PCR-Ansatz gegeben. Nach der PCR wurden 20 µl des Ansatzes mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

10.9 DNA-Sequenzanalyse

Alle neu generierten oder verwendeten Plasmide wurden zur Überprüfung der richtigen Gensequenz von MWG Eurofins analysiert. Nach Angaben des Dienstleisters wurde dazu ein Gemisch aus Plasmid und Sequenzierprimer in einem Volumen von 15 µl versendet, das eine Plasmid-DNA Endkonzentration zwischen 50 und 100 ng µl⁻¹ aufwies und 15 pmol des genutzten Sequenzierprimers enthielt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm „Clone Manager 7“ für Microsoft Windows (Version 7.03, Scientific & Educational Software), sowie dem „BioEdit Sequence Alignment Editor“.

10.10 Restriktionsverdau

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen stammen von der Firma New England Biolabs und wurden nach Angaben des Herstellers verwendet. Standardmäßig wurden die Restriktionen in 50 µl Ansätzen mit für die Restriktionsendonukleasen geeigneten NE-Puffern (NEB) durchgeführt. Die Restriktion wurde 2 h bei 37 °C inkubiert und wenn möglich anschließend hitzeinaktiviert. Die geschnittenen Gen-Produkte wurden anschließend wie beschrieben von Restriktionsendonukleasen und Nukleotiden gereinigt.

10.11 Ligation

Zur Ligation von geschnittenen Plasmiden mit DNA-Fragmenten wurde das Rapid DNA Ligation-Kit (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Ligationsansatz wurde standardmäßig mindestens 20 min bei RT inkubiert.

10.12 Site-directed Mutagenese

Zur gezielten Mutagenese einzelner Basen eines plasmidgebundenen Gens wurde das QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) nach Angaben des Herstellers verwendet.

10.13 Konstruktion von Plasmiden

Alle in dieser Arbeit verwendeten pEKEx2-Derivate enthalten die artifizielle Ribosomenbindestelle AAGGAGA und den Linker TCA direkt vor dem Startcodon des Zielgens. Zur Expression der Gene wird des Weiteren der mit IPTG induzierbare T7-Promotor verwendet. Bei der Expression von zwei Genen auf dem gleichen Plasmid befindet sich die Kombination aus Ribosomenbindestelle und Linker-Region ebenfalls vor dem zweiten Zielgen.

Konstruktion von pEKEX2-*cad*_{opt} und pEKEx2-MSMEG_6856

Das Gen *cad*_{opt} (*cad*-Gen von *A. terreus* mit Anpassung der „codon usage“ an *C. glutamicum*, vgl. Anhang 1) wurde mit den Restriktionsendonukleasen PstI und EcoRI aus dem Plasmid pMK-RQ-*cad*_{opt} (Geneart) ausgeschnitten und in den ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen Vektor pEKEx2 kloniert. Das Gen MSMEG_6856 aus *Mycobacterium smegmatis* wurde mit den Oligonucleotiden MSMEG_6856-fw,

MSMEG_6856-rv und chromosomaler DNA aus *M. smegmatis* vom Startcodon bis zum Stopcodon amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen PstI/EcoRI geschnitten und in den ebenfalls PstI/EcoRI geschnittenen Vektor pEKEx2 eingebracht.

Konstruktion von pEKEx2-*cad*_{opt}-*prpD2*

Die Gene *cad*_{opt} und *prpD2* (cg0759) wurden sequenziell in den Vektor pEKEx2 kloniert. Zunächst wurde das *cad*_{opt}-Gen mit den Oligonukleotiden P1-*cad*_{opt}2-fw und P2-*cad*_{opt}2-rv und dem Plasmid pMK-RQ-*cad*_{opt} als Template-DNA amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen PstI und BamHI geschnitten und in das PstI/BamHI geschnittene Plasmid pEKEx2 kloniert. Das entstandene Plasmid pEKEx2-*cad*_{opt}2 wurde sequenziert und für den nächsten Klonierungsschritt weiterverwendet. Das *prpD2*-Gen wurde mit den Oligonukleotiden P9-*prpD2*-fw und P10-*prpD2*-rv sowie chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC 13032 als Template amplifiziert. Das Amplifikat wurde mit den Restriktionsendonukleasen SacI und EcoRI geschnitten und flussabwärts an das Ende des *cad*-Gens in den SacI/EcoRI geschnittenen Vektor pEKEx2-*cad*_{opt}2 kloniert. Als Ribisomenbindestelle für das *prpD2*-Gen wurde, wie Anfangs beschrieben, die Sequenz AAGGAGA und der Linker TCA genutzt.

Konstruktion von pEKEx2-*cad*_{nat} und pEKEx2-*malEcad*_{opt}

Das Gen *cad*_{nat} wurde mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI aus dem Plasmid pMK-RQ-*cad*_{nat} (Geneart) ausgeschnitten und in den BamHI/EcoRI geschnittenen Vektor pEKEx2 kloniert. Die Klonierung von pEKEx2-*malEcad*_{opt} erfolgte sequentiell. Zunächst wurde das Gen *malE* mit den Oligonukleotiden P1-*malE*-fw und P2-*malE*-rv ohne Signalpeptid und Stopcodon und dem Plasmid pMAL-c als Template-DNA amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen PstI und BamHI geschnitten und in den PstI/BamHI geschnittenen Vektor pEKEx2 kloniert. Das resultierende Plasmid pEKEx2-*malE* wurde für den nächsten Schritt weiterverwendet. In einem zweiten Schritt erfolgte die Amplifizierung des *cad*_{opt}-Gens mit den Oligonukleotiden P3-*malEcad*_{opt}-fw und P4-*malEcad*_{opt}-rv und chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC 13032 als Template. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI geschnitten und flussabwärts an das Ende des *malE*-Gens in das BamHI/EcoRI geschnittene Plasmid pEKEx2-*malE* kloniert.

Konstruktion von pEKEx2-*cad*_{opt}-ATEG_09970 und pEKEx2-*cad*_{opt}-ATEG_09972

Für die Konstruktion der Plasmide pEKEx2-*cad*_{opt}-ATEG_09970 und pEKEx2-*cad*_{opt}-ATEG_09972 wurden die Gene ATEG_09970 und ATEG_09972 mit den Restriktionsendonukleasen SacI/EcoRI aus den Plasmiden pMK-RQ-ATEG_09970 und pMK-RQ-ATEG_09972 (Geneart) ausgeschnitten und in den ebenfalls SacI/EcoRI geschnittenen Vektor pEKEx2-*cad*_{opt}2 kloniert. Als Ribosomenbindestelle wurde die Sequenz AAGGAGA vor dem Startcodon der Zielgene verwendet.

Konstruktion von pET-16b-N-His₁₀-MSMEG_6856

Zur Amplifizierung des Gens MSMEG_6856 wurden die Oligonukleotide MSMEG_6856-fw-2 und MSMEG_6856-rv-2 sowie chromosomale DNA aus *M. smegmatis* verwendet. Das PCR-Produkt wurde NdeI/BamHI verdaut und in den ebenfalls so geschnittenen pET16b Vektor kloniert. Als Ribosomenbindestelle wurde die Standardsequenz des pET-Vektors genutzt.

Konstruktion von pET-TEV1-N-His₁₀-*prpD1* und pET-TEV1-N-His₁₀-MSMEG_6645

Zur Amplifizierung der Gene *prpD1* und MSMEG_6645 wurden die Oligonukleotide *prpD1*-fw, *prpD1*-rv, MSMEG_6645-fw und MSMEG_6645-rv verwendet. Als Template wurde chromosomale DNA aus *C. glutamicum* und *M. smegmatis* verwendet. Die Amplifikationsprodukte wurden NdeI/EcoRI verdaut und in den ebenso geschnittenen Vektor pET-TEV1 kloniert. Die Standardribosomenbindestelle des pET-Vektors wurde verwendet.

11 Proteinbiochemische Methoden

11.1 Zellaufschluss mittels French-Press-Zelle

Der Aufschluss von *E. coli*-Zellen erfolgte mit Hilfe einer French Press Zelle (SLM AMINCO® Spectronic Instruments, Rochester) bei einem Druck von 108 MPa. Dazu wurde das Zellpellet in 20 ml Aufschlusspuffer (TNI5-Puffer) resuspendiert und mit einer Proteaseinhibitor-Tablette „complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor cocktail“ (Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt. Nach dreimaliger Passage in der French Press wurden Zelltrümmer

durch Zentrifugation (20 min bei 5467 *g*, 4 °C) vom Zelllysat getrennt. Im Anschluss erfolgte eine Ultrazentrifugation des zellfreien Überstandes (60 min bei 180000 *g*, 4 °C), die zur Sedimentierung der Membranen führte. Für die Proteinreinigung und die Affinitätsreinigungen wurde der Überstand der Ultrazentrifugation als Rohextrakt eingesetzt.

11.2 Zellaufschluss mittels Silamat

Der Aufschluss von *C. glutamicum*-Zellen für Enzymassays erfolgte mittels Silamat (Vivadent). Zuvor geerntete Zellen wurden in 1 ml des gewünschten Aufschlusspuffers resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf), das ca. 250 mg Glasbeads enthielt, überführt. Die Zellen wurden anschließend für 3 x 20 sec im Silamat aufgeschlossen und zwischen den Aufschlussschritten für je 1 min auf Eis gekühlt. Nach dem Aufschluss wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (15 min, 15000 Upm, 4 °C, Sigma 2K15) vom Zelllysat getrennt. Der nach einer zweiten Zentrifugation (2 min, 15000 Upm, 4 °C, Sigma 2K15) erhaltene gelbliche Überstand konnte als Proteinrohextrakt genutzt werden.

11.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde mit der Bradford-Methode (Bradford, 1976) bestimmt. Dazu wurden je 50 µl Probe mit 1 ml Bradford-Reagenz (Coo Protein Assay, Uptima, Frankreich) versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm (Ultrospec 500 pro Visible Spectrophotometer, Amersham Biosciences) gemessen. Als Standard wurde eine Messreihe von 0 µg ml⁻¹ bis 500 µg ml⁻¹ Rinder-Serumalbumin (BSA) im jeweiligen Proteinpuffer verwendet.

11.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Lösliche und membrangebundene Proteine wurden durch SDS-PAGE (Laemmli, 1970) in vertikalen Gelkammern (MiniProtean-II-Apparatur, BioRad) aufgetrennt. Dazu wurden 15%-ige Trenngele und 6%-ige Sammelgele genutzt. Die Proteinproben wurden mit ¼ Volumen fünffach konzentriertem Ladepuffer (225 mM Tris, 5% (w/v) SDS, 250 mM DTT, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 50% (v/v) Glycerin, pH 6,8) gemischt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Als Größenstandard wurde der Precision Plus Protein Unstained oder der Dual Color Standard (Biorad) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke (0,02 A pro Gel) und einer maximalen Spannung von 200 V.

Zur Sichtbarmachung der Proteine auf den SDS-Gelen wurden diese routinemäßig mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Nach Angaben des Herstellers wurden dazu 50 ml der Fertiglösung GelCode® Blue Stain Reagent (Pierce, Rockford, Illinois, USA) genutzt. Die Gele wurden zunächst dreimal 10 min in bidest. H₂O geschwenkt, anschließend eine Stunde gefärbt und dann mindestens eine Stunde mit H₂O entfärbt.

11.5 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Zur Reinigung Polyhistidin-„getaggtter“ Proteine wurden mit 2 ml suspendierter Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen) befüllte Polypropylen-Säulen (Qiagen) verwendet. Das Bettvolumen von 1 ml wurde anschließend mit einer Fritte abgedeckt. Zur Äquilibration der Säulen wurden 25 ml TNI5-Puffer verwendet. Der Proteinrohextrakt konnte anschließend auf die Säule gegeben werden. Mit einer Waschprozedur, bei der zunächst 10 ml TNI30-Puffer bzw. 10 ml TNI50-Puffer auf die Säule gegeben wurden, wurden schwach bzw. unspezifisch gebundene Proteine von der Säule gewaschen. Die spezifisch gebundenen und mit Polyhistidin-„Tag“ versehenen Proteine wurden anschließend mit 10 ml TNI100- TNI200- und TNI400-Puffer von der Säule eluiert. Nicht eluierte Proteine wurden anschließend mit einem „Strip“-Puffer entfernt. Dieser enthält EDTA und entfernt die Ni²⁺-Ionen von der Säule, die anschließend bis zum nächsten Gebrauch bei 4 °C gelagert werden kann. Die erneute Beladung mit Ni²⁺-Ionen erfolgte mit 10 ml 100 mM NiSO₄. Die eluierten Proteinfraktionen wurden anschließend qualitativ auf ihren Proteingehalt untersucht. Dazu wurde jeder Elutionsfraktion 10 µl entnommen und 100 µl Bradford-Reagenz (Coo Protein Assay, Uptima, Frankreich) beigelegt. Eine Blaufärbung der entstehenden Lösung zeigt an, dass Protein vorhanden war. Gereinigte Proteinfraktionen wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert und nach Analyse der SDS-PAGE gegebenenfalls vereinigt.

11.6 Pufferaustausch durch Gelfiltration mit Hilfe von PD-10-Säulen

Der Pufferaustausch von Proteinlösungen erfolgte durch Gelfiltration mit Sephadex-G25-Material. Dazu wurden PD-10-Säulen (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers verwendet. Von der Säule wurde die Kappe entfernt und die Ausflussspitze abgeschnitten. Nach Äquilibration mit 25 ml des gewünschten Puffers wurden 2,5 ml Proteinlösung aufgetragen. Das Protein wurde anschließend mit 5 ml des gewünschten Puffers eluiert und in 1,5 ml Eppendorfgefäßen fraktioniert. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde,

wie in Punkt 11.5 beschrieben, untersucht. Die Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen wurden anschließend vereinigt. Bei niedrigen Konzentrationen wurden die vereinigten Fraktionen mittels Vivaspin 20 ml (MWCO 10000) nach Angaben des Herstellers durch Zentrifugation bei 4 °C auf das gewünschte Volumen reduziert.

11.7 Enzymassays

11.7.1 Bestimmung der *cis*-Aconitat-Decarboxylase (CAD)-Enzymaktivität

Die Enzymaktivität des CAD-Proteins wurde nach der von Bentley und Thiessen beschriebenen Methode (Bentley und Thiessen, 1957c) gemessen. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung, nach 8, 12, 24 und 48 h, wurden dazu Zellen der Produktionsstämme geerntet und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen (einer OD₆₀₀ von 150 entsprechend) wurden anschließend in 0,2 M Natriumphosphat-Puffer, pH 6,5 resuspendiert und mittels Silamat aufgeschlossen. 100 µl des Proteinrohextrakts wurden mit 820 µl des bei 30 °C vorinkubierten Aufschlusspuffers versetzt und dann die Reaktion mit 80 µl *cis*-Aconitat (8 mM finale Konzentration) gestartet. Nach 10-minütiger Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 33 µl 12 M HCl gestoppt. Die Konzentration der gebildeten Itaconsäure wurde anschließend mittels HPLC-Analyse bestimmt, die Proteinkonzentration des Zellextraktes mittels Bradford-Assay. 1 Unit CAD-Aktivität (1 U) entspricht der Bildung von 1 µmol Itaconat pro min.

11.7.2 Bestimmung der Isocitrat-Dehydrogenase (ICD)-Enzymaktivität

Die Messung der Enzymaktivität der Isocitrat-Dehydrogenase wurde in Anlehnung an die von Eikmanns (Eikmanns *et al.*, 1995) beschriebenen Methode durchgeführt. Dazu wurden die zu testenden Stämme in 60 ml mCGXII-Minimalmedium kultiviert, bei einer OD₆₀₀ von 10 geerntet, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Durchführung des Enzymassays bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden in 1 ml Aufschlusspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0) resuspendiert und mittels Silamat aufgeschlossen. Der Zellrohextrakt wurde durch anschließende Zentrifugation (15 min, 15000 Upm, 4 °C, Zentrifuge Sigma 2K15) von den Zelltrümmern getrennt. Nach einer zweiten Zentrifugation (2 min, 15000 Upm, 4 °C, Sigma 2K15) wurde der Überstand abgenommen und als Proteinrohextrakt für den Enzymassay eingesetzt. Dazu wurden 990 µl Assaypuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM MgCl₂, 1 mM

NADP⁺ und 20 mM DL-Isocitrat) bei 30 °C 5 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl des Proteinrohextrakts gestartet und bei 340 nm photometrisch verfolgt. 1 Unit ICD-Aktivität (1 U) entspricht der Bildung von 1 µmol α-Ketoglutarat pro min.

11.7.3 Bestimmung der Aconitase Enzymaktivität

Die Enzymaktivität der putativen Aconitasen aus *A. terreus* sowie die Aktivitäten der 2-Methylcitrat-Dehydratasen wurde nach der von Baumgart (Baumgart und Bott, 2011) beschriebenen Methode gemessen. Die *E. coli*-Stämme BL21(DE3)/pET-TEV1-*aco1*, BL21(DE3)/pET-TEV1-*aco2* und BL21(DE3)/pET-TEV1-*aco3* wurden wie in Kapitel 7.2 beschrieben kultiviert. Nach Aufschluss der Zellen durch French-Press und Reinigung des Proteins über Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurde die Proteinlösung auf 400 µl konzentriert. Die putativen Aconitasen wurden anschließend mit einer Aktivierlösung (14 µl 100 mM (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, 12 µl 100 mM Na₂S und 10 µl 1 M Dithiothreitol ad 2 ml H₂O) bei 25 °C für 20 min inkubiert. Auf diese Weise kann das 4Fe-4S-Zentrum der Aconitase reassembliert werden. Nach Zentrifugation (16000 *g*, 10 min, 4 °C) und Pufferaustausch (PD10-Säule) wurde die aktivierte Proteinlösung kurz mit Stickstoff begast und dann in den Enzymassay eingesetzt. Dazu wurde 1 ml Assaypuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM Na-Citrat) bei 30 °C 5 min vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 10 µl der aktivierten Proteinlösung gestartet. Die Umsetzung von Citrat zu *cis*-Aconitat konnte photometrisch bei 240 nm in UV-Küvetten verfolgt werden. 1 Unit Aconitase-Aktivität (1 U) entspricht der Bildung von 1 µmol *cis*-Aconitat pro min.

V Ergebnisse

1 Analyse der Itaconat-Toleranz von *C. glutamicum* und Fähigkeit zur Itaconat-Verstoffwechselung

Neben der chemischen Synthese von Itaconsäure sind verschiedene Pilzspezies in der Lage, Itaconsäure biologisch aus erneuerbaren Rohstoffen zu produzieren. Dazu gehören u.a. *Ustilago zae*, *Ustilago maydis*, *Candida sp.*, *Rhodotorula sp.* und *Aspergillus terreus*. Bakterielle Itaconsäure-Produzenten sind jedoch nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das Gram-positive Bodenbakterium *C. glutamicum*, das neben Aminosäuren auch sehr effizient eine Reihe von organischen Säuren bilden kann, in der Lage ist, Itaconat zu produzieren. In vorbereitenden Arbeiten sollte geklärt werden, ob *C. glutamicum* Itaconat als Kohlenstoffquelle nutzen oder zumindest verstoffwechseln kann und ob Itaconat einen toxischen Effekt auf das Wachstum von *C. glutamicum* hat. In diesem Fall wäre *C. glutamicum* als potentieller Produktionsstamm nicht geeignet, zumindest nicht ohne entsprechende Modifikationen, wie z. B. das Ausschalten von Itaconat-abbauenden Enzymen. Um den Einfluss von Itaconat auf das Wachstum von *C. glutamicum* zu testen, wurden Kultivierungen in Anwesenheit verschiedener Itaconat-Konzentrationen durchgeführt. Dazu wurde das mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose und 50, 250 oder 500 mM Na-Itaconsäure supplementiert, welche zuvor mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt wurde. Als Kontrolle wurde das Natriumsalz NaCl in einer Konzentration von 500 mM genutzt (Abbildung 5).

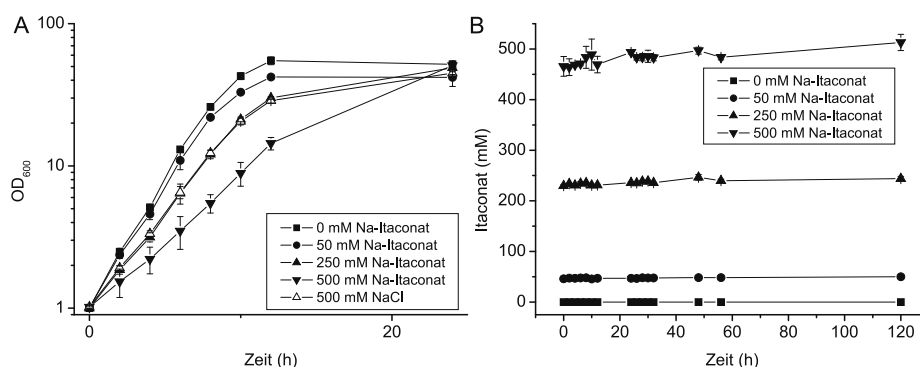


Abbildung 5: Wachstum (A) und Metabolisierungsprofil (B) von *C. glutamicum* in mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose als Kohlenstoffquelle und verschiedenen Mengen Na-Itaconat bzw. 500 mM NaCl.

Abbildung 5A zeigt, dass *C. glutamicum* in Anwesenheit verschiedener Na-Itaconat-Konzentrationen wachsen kann. Bei steigender Konzentration sinkt jedoch die Wachstumsrate von $0,41 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ (ohne Itaconat-Zugabe) auf $0,21 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ bei Anwesenheit von 500 mM Na-Itaconat (Tab. 7). Die Zugabe von 500 mM NaCl hatte den gleichen Effekt auf das Wachstum wie die Zugabe von 250 mM Na-Itaconat. Da 1 Mol Itaconsäure 2 Mol Na^+ -Ionen binden kann, ist die Wachstumsinhibierung vermutlich auf Na^+ und nicht auf Itaconat zurückzuführen. In Abbildung 5B ist dargestellt, dass die Konzentration von Itaconat während der Kultivierung unverändert bleibt. Eine Itaconat-Verstoffwechselung unter diesen Bedingungen ist also ausgeschlossen. Die Schwankungen bei 500 mM Itaconat könnten auf die hohe Verdünnungen zurückzuführen sein, die notwendig waren, um in den linearen Bereich der HPLC-Analytik zu kommen.

Weil Itaconsäure für *C. glutamicum* ein unnatürliches Substrat ist, sollte zudem eine weitere Wachstumsbedingung getestet werden, um auszuschließen, dass diese Säure ausschließlich bei Wachstum auf Glucose nicht verstoffwechselt wird. Dazu wurde die Expression der Gene für die Citrat-Transporter CitH und TctABC durch Zugabe von 50 mM Calciumcitrat und 5 mM Calciumchlorid aktiviert (Brocker *et al.*, 2009). Aufgrund der Strukturähnlichkeiten könnte Itaconat möglicherweise von diesen Transportern als Substrat akzeptiert und in die Zelle transportiert werden. Die Vorkultur erfolgte bei gleichen Bedingungen, wobei zusätzlich 50 mM Glucose supplementiert wurde. In Abb. 6 ist zu erkennen, dass die Zugabe von Itaconat auch beim Wachstum von *C. glutamicum* mit Citrat als Kohlenstoffquelle keinen toxischen Effekt hat und während der Kultivierung ebenfalls nicht metabolisiert wird. Die Wachstumsrate sinkt in Anwesenheit von 50 mM Na-Itaconat von $0,27 \text{ h}^{-1}$ auf $0,25 \text{ h}^{-1}$. Damit sind wichtige Voraussetzungen für die Produktion von Itaconat mit *C. glutamicum* gegeben: Itaconat hat keinen toxischen Effekt auf die Zellen und wird bei Zugabe in das Kulturmedium auch nicht metabolisiert.

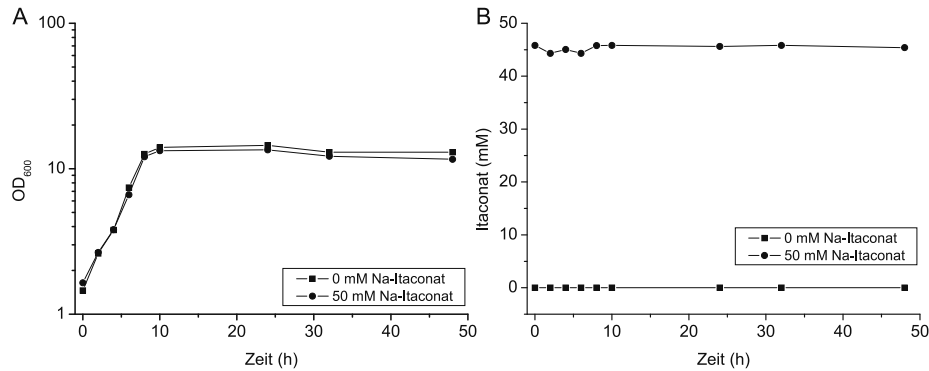


Abbildung 6: (A) Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* in mCGXII-Minimalmedium mit 50 mM Calciumcitrat als Kohlenstoffquelle und 0 mM bzw. 50 mM Na-Itaconat als Supplement. (B) Itaconat-Konzentration im Medium.

Tabelle 7: Wachstumsraten von *C. glutamicum* ATCC 13032 in Anwesenheit von verschiedenen Itaconat-Konzentrationen in mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose oder 50 mM Calciumcitrat als Kohlenstoffquelle. Die Versuche mit Glucose wurden in drei biologischen Replikaten durchgeführt, die Versuche mit Citrat in zwei biologischen Replikaten.

Kultivierungsansatz	Wachstumsrate μ (h ⁻¹)
mCGXII + 4% (w/v) Glucose und 0 mM Na-Itaconat	0,41 ± 0,01
mCGXII + 4% (w/v) Glucose und 5 mM Na-Itaconat	0,41 ± 0,01
mCGXII + 4% (w/v) Glucose und 50 mM Na-Itaconat	0,38 ± 0,01
mCGXII + 4% (w/v) Glucose und 250 mM Na-Itaconat	0,31 ± 0,01
mCGXII + 4% (w/v) Glucose und 500 mM Na-Itaconat	0,21 ± 0,02
mCGXII + 4% (w/v) Glucose und 500 mM NaCl	0,31 ± 0,01
mCGXII + 50 mM Ca-Citrat und 0 mM Na-Itaconat	0,27
mCGXII + 50 mM Ca-Citrat und 50 mM Na-Itaconat	0,25

2 Konstruktion und Analyse eines Itaconat-Produktionsstammes (1. Generation)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Itaconat keinen toxischen Effekt auf das Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* hat und eine Verstoffwechselung nicht stattfindet, konnte mit der Konstruktion des ersten Itaconat-Produktionsstammes begonnen werden. Trotz der Existenz verschiedener natürlicher Itaconsäure-Produzenten ist die *cis*-Aconitat-Decarboxylase (CAD) aus *Aspergillus terreus* bisher das einzig bekannte Enzym zur Umwandlung von *cis*-Aconitat in Itaconat (Willke und Vorlop 2001; Okabe *et al.*, 2009). Die große Diskrepanz der K_m -Werte der CAD aus *A. terreus* (2,45 mM (Dwiarti *et al.*, 2002)) und

der Aconitase aus *C. glutamicum* (19 μ M (Baumgart und Bott 2011)) zum Substrat *cis*-Aconitat könnte dazu führen, dass die *cis*-Aconitat-Decarboxylase nicht genügend Substrat zur Bildung von Itaconat erhält. Um daher eine breitere Auswahl an Enzymen zur Verfügung zu haben, wurde eine *in-silico*-Suche (www.uniprot.org) nach CAD-Orthologen durchgeführt, bei der die Aminosäuresequenz des CAD-Proteins von *A. terreus* als Template genutzt wurde (siehe Anhang 2). Als Ausschlusskriterium wurde nach Orthologen gesucht, die eine Sequenzidentität von mindestens 30% zum *A. terreus* CAD-Protein aufwiesen, obwohl auch niedrigere Sequenzidentitäten auf Homologie hindeuten können. In den Itaconsäure-Produzenten *Ustilago zaeae*, *Ustilago maydis*, *Candida sp.* oder *Rhodotorula sp.* wurden keine Proteine gefunden, die dieses Kriterium erfüllen. Bei den 27 im Anhang aufgelisteten homologen Proteinen handelte es sich um putative Proteine mit MmgE/PrpD-Domäne, sowie 2-Methylcitrat-Dehydratasen, bei denen diese Domäne entdeckt wurde (Anhang, Tab. 18). Umso interessanter war das Auftreten eines homologen Proteins in dem nahverwandten Bakterium *Mycobacterium smegmatis*. Das Gen MSMEG_6856 codiert für ein Protein mit 40%-iger Sequenzidentität zum *A. terreus* CAD-Protein. Zur Konstruktion eines ersten Itaconat-Produktionsstammes von *C. glutamicum* wurde daher das *cad*-Gen aus *A. terreus* sowie das Gen MSMEG_6856 aus *M. smegmatis* ausgewählt, um diese in *C. glutamicum* zu exprimieren.

2.1 Analyse des Itaconat-Produktion von *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} und *C. glutamicum*/pEKEx2-MSMEG_6856

Für die ersten Produktionsversuche wurden die Stämme *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} und *C. glutamicum*/pEKEx2-MSMEG_6856 konstruiert. Das Plasmid pEKEx2-*cad*_{opt} enthält das von der Firma Life Technologies chemisch synthetisierte *cad*-Gen aus *A. terreus* mit einem für *C. glutamicum* optimierten Codon-Gebrauch („codon usage“). Das Plasmid pEKEx2-MSMEG_6856 enthält das in dem Sequenzvergleich entdeckte Gen MSMEG_6856 aus *M. smegmatis*. (siehe Anhang 2). Die Plasmide wurden wie beschrieben konstruiert (Material und Methoden 10.13) und in den Wildtypstamm *C. glutamicum* ATCC 13032 eingebracht. Die entstandenen Stämme *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt}, *C. glutamicum*/pEKEx2-MSMEG_6856 sowie der Kontrollstamm *C. glutamicum*/pEKEx2 wurden bezüglich Wachstum und Itaconat-Bildung getestet (Abb. 7). Dazu wurden sie in mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose bei 30 °C kultiviert. Die Produktion der heterologen Proteine wurde von Beginn an mit

0,5 mM IPTG induziert. Außerdem wurde nach 8 h, 12 h, 24 h und 48 h die CAD-Enzymaktivität der drei Stämme gemessen. Die Itaconat-Bildung wurde mittels HPLC verfolgt.

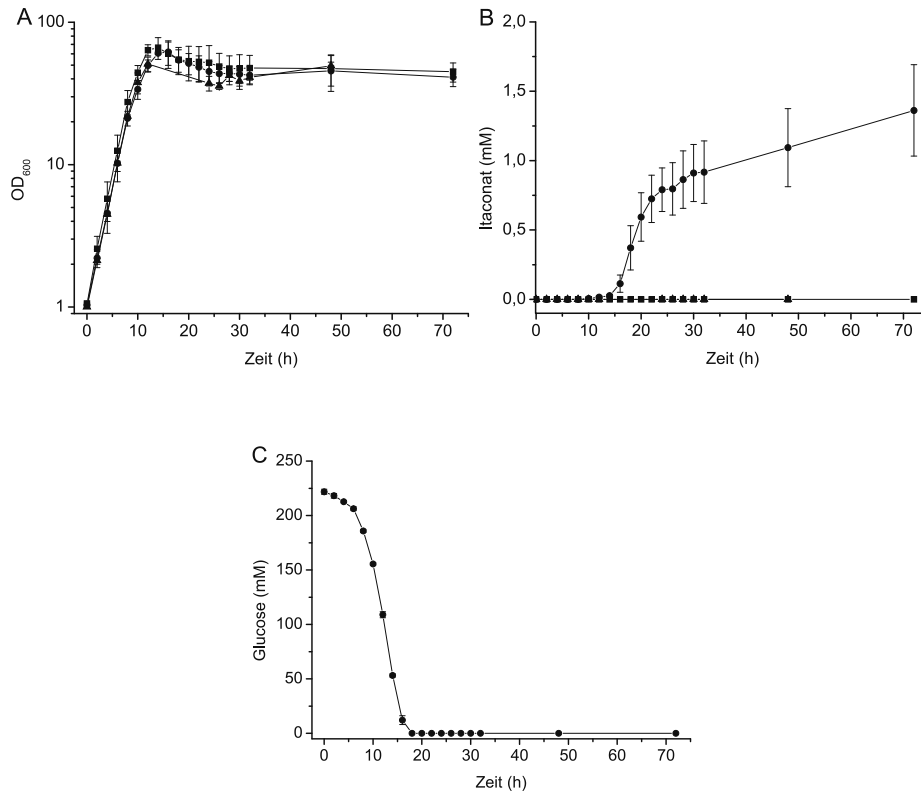


Abbildung 7: Wachstum (A) und Itaconat-Produktion (B) der Stämme *C. glutamicum/pEKEx2* (■), *C. glutamicum/pEKEx2-cad_{opt}* (●) und *C. glutamicum/pEKEx2-MSMEG_6856* (▲) in mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose, 25 µg ml⁻¹ Kanamycin und 0,5 mM IPTG. (C) Glucoseverbrauch von *C. glutamicum/pEKEx2-cad_{opt}* bei obiger Kultivierung. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten.

Das Wachstum der Stämme *C. glutamicum/pEKEx2-cad_{opt}* und *C. glutamicum/pEKEx2-MSMEG_6856* war mit dem des Kontrollstamms (*C. glutamicum/pEKEx2*) vergleichbar (Abbildung 7A), die Wachstumsraten waren mit $0,38 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ bzw. $0,39 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ nur leicht reduziert gegenüber der Kontrolle ($0,41 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$). *C. glutamicum/pEKEx2-cad_{opt}* war der einzige Stamm, der Itaconat produzierte, und zwar $1,4 \pm 0,3 \text{ mM}$ nach 72 h. Itaconat war erstmals nach 10 h im Medium detektierbar, die Hauptproduktion startete jedoch erst nach ca. 16 h (Abbildung 7B). Itaconat scheint also erst in der stationären Phase gebildet zu

werden. Die Itaconat-Produktion hielt auch nach Verbrauch der Glucose im Medium (Abbildung 7C) an. Die Identität des produzierten Itaconat wurde zudem durch eine GC-TOF-MS- Analyse bestätigt (Abbildung 8). Hierbei konnten u.a. die beiden mit den roten Pfeilen markierten Itaconat-Derivate mit den Massen 259 Da und 274 Da identifiziert werden. Dabei handelt es sich um Itaconat-Derivate, welche mit je zwei tri-Methyl-Silyl-Resten substituiert wurden. Durch die Ionisationsmethode kann es dazu kommen, dass die Moleküle in Bruchstücke zerfallen und Methylgruppen beispielsweise abgespalten werden. Dies macht sich in den detektierten Massen (u.a. 259 Da und 274 Da) bemerkbar. Das Referenzspektrum der reinen Itaconsäure ist oben rechts dargestellt.

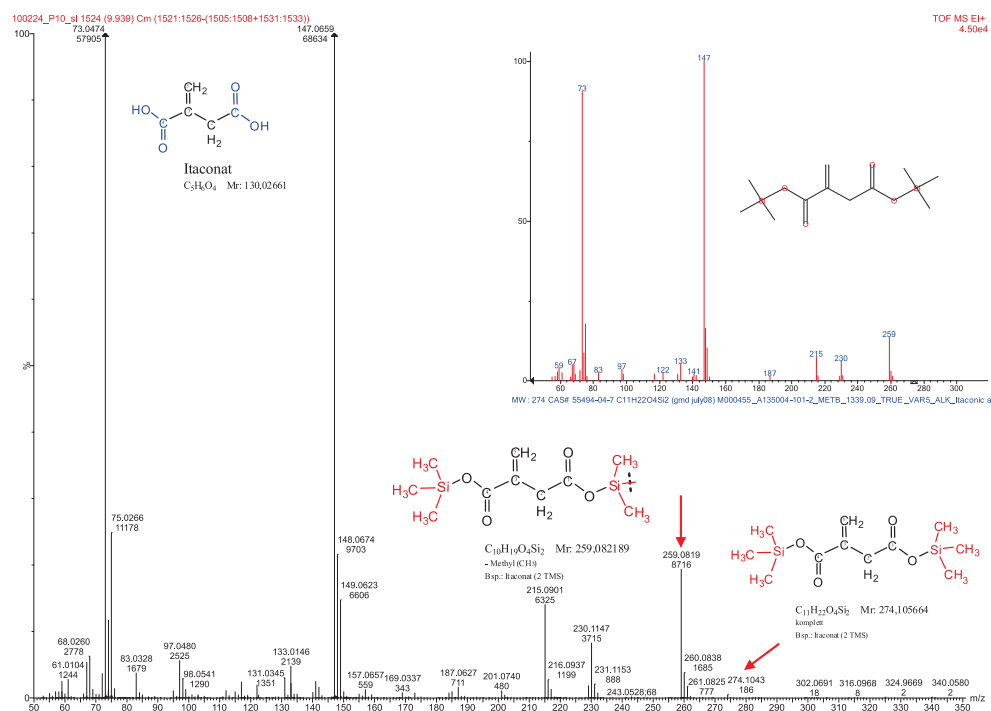


Abbildung 8: GC-TOF-MS-Analyse des Kulturüberstandes des Stammes *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} nach 24 Stunden. Die mit roten Pfeilen markierten Peaks entsprechen den gemessenen Itaconat-Derivaten.

Die Itaconat-Bildung korrelierte mit den CAD-Enzymassays. Ausschließlich im Rohextrakt des Stammes *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} konnte CAD-Aktivität nachgewiesen werden. Der Enzymassay zeigte, dass die CAD-Aktivität im Stamm *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} zunächst sehr gering war und im Laufe der Kultivierung zunahm (Tab. 8). Mit $56 \pm 36 \text{ mU mg}^{-1} \text{ Protein}$

wurde die höchste CAD-Aktivität nach 48 Stunden erreicht. Zum Zeitpunkt der Hauptproduktionsphase lag die Enzymaktivität im Rohextrakt zwischen $10 \pm 3 \text{ mU mg}^{-1}$ und $38 \pm 4 \text{ mU mg}^{-1}$ Protein. Bei den Stämmen *C. glutamicum*/pEKEx2 und *C. glutamicum*/pEKEx2-MSMEG_6856, die kein Itaconat produzierten, konnte auch keine CAD-Enzymaktivität im Rohextrakt gemessen werden.

Tabelle 8: CAD-Aktivität in Rohextrakten der Stämme *C. glutamicum*/pEKEx2, *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} und *C. glutamicum*/pEKEx2-MSMEG_6856 nach Kultivierung in mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose.

Stamm	Enzymaktivität (mU mg^{-1})			
	8 h	12 h	24 h	48 h
<i>C. glutamicum</i> /pEKEx2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>C. glutamicum</i> /pEKEx2- <i>cad</i> _{opt}	10 ± 4	10 ± 3	38 ± 4	56 ± 36
<i>C. glutamicum</i> /pEKEx2-MSMEG_6856	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

2.2 Heterologe Überproduktion, Reinigung und Charakterisierung von N-His₁₀-MSMEG_6856 aus *Mycobacterium smegmatis* in *E. coli* BL21(DE3)

Da im vorangegangenen Versuch mit dem Stamm *C. glutamicum*/pEKEx2-MSMEG_6856 kein Itaconat produziert werden konnte und der Enzymassay mit dem Proteinrohextrakt negativ ausgefallen war, sollte das Protein überproduziert, gereinigt und erneut auf CAD-Aktivität getestet werden. Dazu wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid pET16b-MSMEG_6856 (Material und Methoden 10.3) transformiert. Mit Hilfe des resultierenden Stamms BL21(DE3)/pET16b-MSMEG_6856 ließ sich das von MSMEG_6856 kodierte Protein mit einem Decahistidin-„Tag“ (N-His₁₀-MSMEG_6856; 53,4 kDa) erfolgreich überproduzieren und reinigen (Abb. 9).

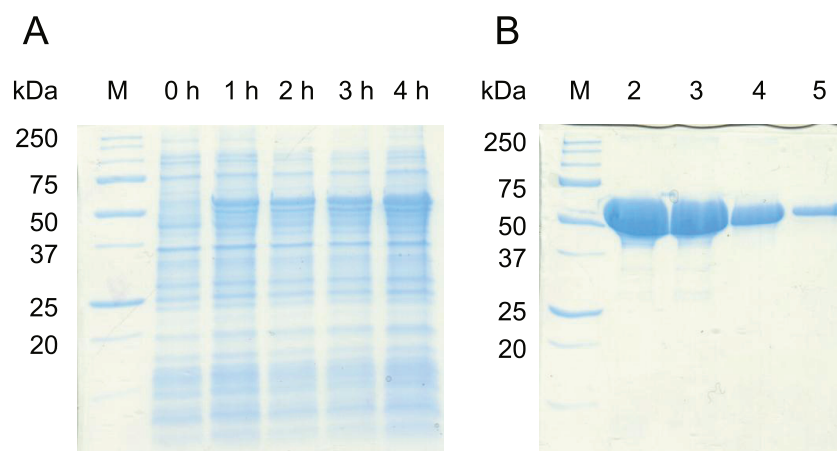


Abbildung 9: SDS-PAGE-Analyse der Überproduktion (A) und Reinigung (B) von N-His₁₀-MSMEG_6856 aus *E. coli* BL21(DE3)/pET16b-MSMEG_6856. (A) Rohextrakte vor (0 h) und 1, 2, 3 und 4 h nach IPTG-Zugabe. (B) Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Aufgetragen wurden die Fraktionen 2-5 nach Elution mit TNI400-Puffer. M: Precision Plus Protein Unstained Standard (Biorad).

Die SDS-PAGE zur Überprüfung der Überproduktion des MSMEG_6856-Proteins zeigte bereits eine Stunde nach IPTG-Induktion eine dominant auftretende Bande mit einer apparenten Masse von über 50 kDa. Diese Bande wurde im Lauf der Kultivierung noch stärker und korreliert mit der theoretischen Masse des Proteins (53,4 kDa). Die SDS-PAGE zur Reinigung des Proteins (9B) zeigt die Fraktionen 2-5 nach Elution mit TNI400-Puffer. Das Protein konnte somit nach Waschen mit TNI50- und TNI100-Puffer in ausreichender Menge und Reinheit gewonnen werden. Nach Vereinigung der Fraktionen 2 und 3 sowie einer Umpufferung des Proteins in 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 fiel jedoch ein Großteil des Proteins aus. Aus diesem Grund wurde der lösliche Teil des Proteins aus der geringer konzentrierten Elutionsfraktion 4 umgepuffert. So wurde 1,1 mg gereinigtes Protein erhalten. Mit dem gereinigten Protein wurde der CAD-Enzymassay erneut durchgeführt, jedoch konnte auch dabei keine CAD-Aktivität durch HPLC-Analysen nachgewiesen werden. Für die Konstruktion weiterer Itaconat-Produktionsstämme wurde dieses Protein daher nicht mehr verwendet. Da das Protein laut Annotation eine MmgE/PrpD-Domäne enthält, die, ausgenommen vom CAD-Protein, vorwiegend in 2-Methylcitrat-Dehydratasen vorkommt, wurde auch getestet, ob N-His₁₀-MSMEG_6856 Citrat zu *cis*-Aconitat umsetzen kann. Diese Reaktion kann auf Grund der Ähnlichkeit von Citrat zu 2-Methylcitrat bei 2-Methylcitrat-Dehydratasen stattfinden. Doch auch hier zeigte sich keine Aktivität, so dass das natürliche Substrat des Proteins weiterhin unbekannt bleibt.

3 Versuche zur Erhöhung der intrazellulären *cis*-Aconitat-Konzentration mit Hilfe von 2-Methylcitrat-Dehydratasen

Mit Hilfe des Stammes *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} konnte der Machbarkeitsnachweis („proof of concept“) für die Itaconat-Produktion mit *C. glutamicum* erbracht werden. Der relativ niedrige Itaconat-Titer zeigte jedoch, dass bei der Produktion ein metabolischer Flaschenhals („bottleneck“) vorliegt. Da die Bereitstellung von *cis*-Aconitat als direkte Biosynthesestufe als limitierender Faktor angesehen werden kann, wurde nach Enzymen gesucht, die *cis*-Aconitat bereitstellen können. Neben Aconitasen, die *cis*-Aconitat ausschließlich als Intermediat bei der reversiblen Umwandlung von Citrat in Isocitrat bilden, sind keine weiteren Enzyme mit *cis*-Aconitat als Reaktionsprodukt bekannt. Jedoch wurde gezeigt, dass eine 2-Methylcitrat-Dehydratase, PrpD aus *E. coli*, neben der Dehydratisierung von 2-Methylcitrat zu 2-Methyl-*cis*-Aconitat mit sehr geringer Aktivität auch Citrat zu *cis*-Aconitat umsetzen kann (Brock *et al.*, 2002). Aus diesem Grund sollten weitere 2-Methylcitrat-Dehydratasen auf ihre Citrat-Dehydratase-Aktivität überprüft und gegebenenfalls später simultan mit der *cis*-Aconitat-Decarboxylase in *C. glutamicum* überproduziert werden. Für diesen Zweck wurden die zwei bekannten 2-Methylcitrat-Dehydratasen PrpD1 und PrpD2 aus *C. glutamicum* sowie die 2-Methylcitrat-Dehydratase 2 (2-Mcd2) aus *M. smegmatis* ausgewählt.

3.1 Heterologe Überproduktion und Reinigung von PrpD1-, PrpD2- und 2-Mcd2-Derivaten

Für die heterologe Überproduktion und Reinigung der 2-Methylcitrat-Dehydratasen wurden die Plasmide pET-TEV1-*prpD1* und pET-TEV1-MSMEG_6645 konstruiert (Material und Methoden 10.13). Diese Plasmide codieren jeweils für Protein-Derivate, die einen aminoterminalen His₁₀-„Tag“ und eine TEV-Schnittstelle tragen. Das Plasmid pET-TEV1-*prpD2* wurde von Dr. Meike Baumgart zur Verfügung gestellt (Baumgart, unveröffentlicht). *E. coli* BL21(DE3) wurde mit den drei Plasmiden transformiert und die resultierenden Stämme BL21(DE3)/pET-TEV1-*prpD1*, BL21(DE3)/pET-TEV1-*prpD2* und BL21(DE3)/pET-TEV1-MSMEG_6645 in 1 l LB-Medium kultiviert. Überproduktion, Probenahme und Reinigung wurden wie in Material und Methoden (7.2 und 11) beschrieben, durchgeführt (Abb. 10 und 11). Die SDS-PAGE-Analysen zur Überprüfung der Überproduktion der Fusionsproteine N-His₁₀-PrpD1, N-His₁₀-PrpD2 und N-His₁₀-MSMEG_6645 zeigten, dass bereits 1 Stunde nach

IPTG-Induktion Proteinbanden mit apparenten Massen von etwa 60 kDa auftraten (Abbildung 10A, 10B und 10C). Die theoretischen Massen sind 58,5 kD für N-His₁₀-PrpD1, 58,9 kDa für N-His₁₀-PrpD2 und 58,6 kDa für N-His₁₀-MSMEG_6645. Bei allen drei Proteinen nimmt die Bandenintensität mit der Kultivierungszeit weiter zu. Die Überproduktion der N-His₁₀-„getaggen“ 2-Methylcitrat-Dehydratasen war somit erfolgreich.

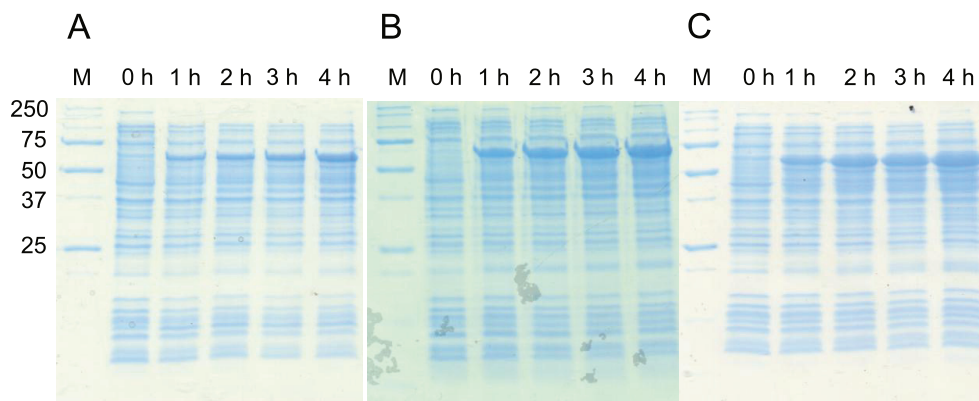


Abbildung 10: SDS-PAGE-Analyse der Überproduktion von (A) N-His₁₀-PrpD1, (B) N-His₁₀-PrpD2 und (C) N-His₁₀-MSMEG_6645 mit Hilfe der *E. coli*-Stämme BL21(DE3)/pET-TEV1-*prpD1*, BL21(DE3)/pET-TEV1-*prpD2* und BL21(DE3)/pET-TEV1-MSMEG_6645. Aufgetragen wurden Zellrohextrakte vor (0 h) und 1, 2, 3 und 4 h nach IPTG-Induktion. M: Precision Plus Protein Unstained Standard (Biorad).

Ergebnisse

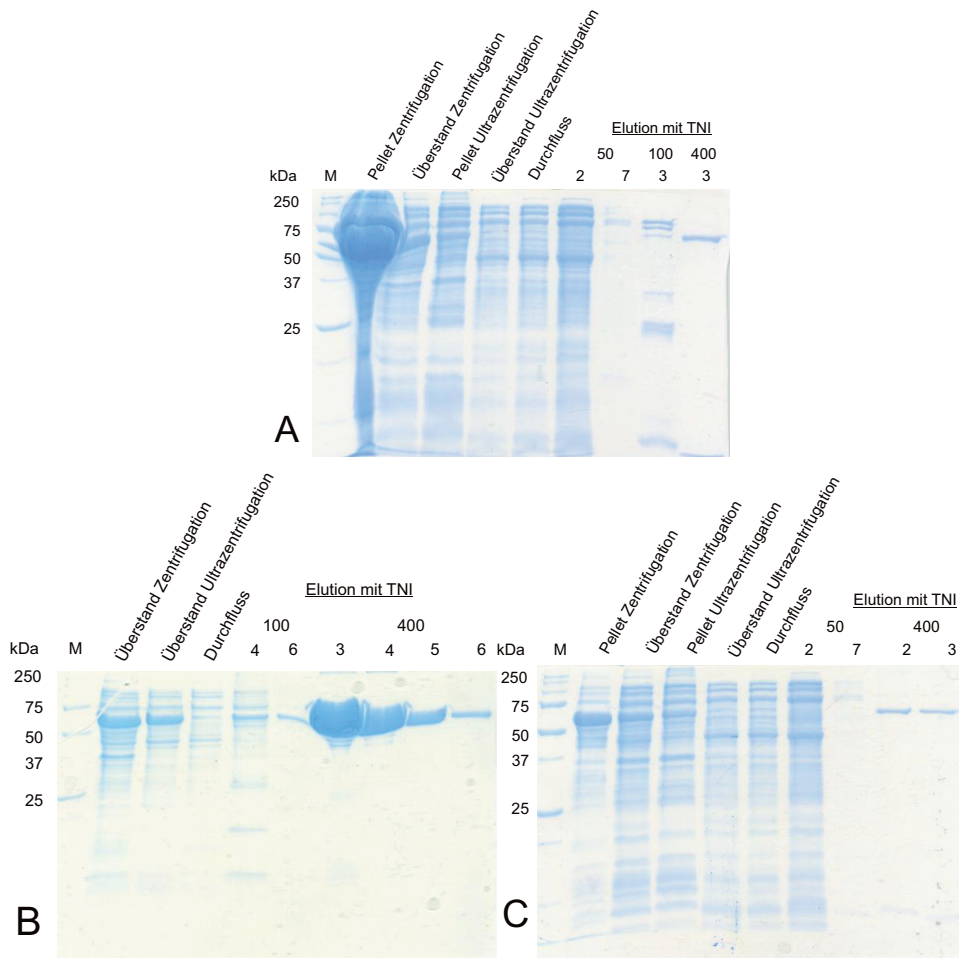


Abbildung 11: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von (A) N-His₁₀-PrpD1, (B) N-His₁₀-PrpD2 und (C) N-His₁₀-MSMEG_6645 aus den *E. coli*-Stämmen BL21(DE3)/pET-TEV1-*prpD1*, BL21(DE3)/pET-TEV1-*prpD2* und BL21(DE3)/pET-TEV1-MSMEG_6645 mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie. Aufgetragen sind Proben der verschiedenen Fraktionierungs- und Reinigungsschritte (TNI50 und TNI100) sowie der Elutionsfraktionen mit TNI400-Puffer. M: Precision Plus Protein Unstained Standard (Biorad).

Die SDS-PAGE-Analysen zur Reinigung der Proteine zeigten ein sehr unterschiedliches Verhalten der drei Proteine. Im Fall von N-His₁₀-PrpD1 befand sich ein Großteil des überproduzierten Proteins nach der ersten Zentrifugation des Rohextraktes im Sediment (Abbildung 11A), was stark darauf hindeutet, dass bei der Überproduktion „Inclusion Bodies“ gebildet wurden. Die Produktionsbedingungen für dieses Protein waren also nicht optimal. Auch eine Kultivierung über Nacht bei 16 °C zeigte kein verbessertes Ergebnis. Nach Waschen mit TNI50-Puffer und Elution mit TNI400 waren 0,3 mg an gereinigtem N-His₁₀-PrpD1-Protein verfügbar, ausgehend von der 1 l-Kultur. Die Reinigung von

N-His₁₀-PrpD2 verlief erfolgreicher. Nach Waschen der Ni-NTA-Säule mit 10 ml TNI100-Puffer und Elution mit TNI400-Puffer konnten 14,5 mg gereinigtes Protein erhalten werden (Abbildung 11B). Die Reinigung von N-His₁₀-MSMEG_6645 ähnelte der von N-His₁₀-PrpD1. Die Pellet-Fraktion nach der ersten Zentrifugation wies „Inclusion Bodies“ auf. Nach Waschen mit 10 ml TNI50-Puffer und Elution mit TNI400-Puffer konnten 0,17 mg gereinigtes Protein erhalten werden (Abbildung 11C). Für den Enzymassay wurden die Proteine in 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 umgepuffert. Die Umsetzung von Citrat zu *cis*-Aconitat wurde photometrisch bei 240 nm verfolgt (Material und Methoden 11.7.3). Die Enzymaktivitäten der drei Fusionsproteine sind in Tabelle 9 zusammengefasst. N-His₁₀-PrpD2 zeigte mit $0,22 \pm 0,01 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ die höchste Citrat-Dehydratase-Aktivität. Auf Grund dieses Ergebnisses wurde *prpD2* für die simultane Überexpression mit dem *cad*-Gen ausgewählt.

Tabelle 9: Spezifische Citrat-Dehydratase-Aktivitäten der gereinigten Proteine N-His₁₀-PrpD1 und N-His₁₀-PrpD2 aus *C. glutamicum* sowie von N-His₁₀-MSMEG_6645 aus *M. smegmatis*. Zum Vergleich ist die Aktivität des gereinigten PrpD-Proteins von *E. coli* angegeben, die von Brock *et al.* 2002 publiziert wurde (Brock *et al.*, 2002).

Organismus	2-Methylcitrat-Dehydratase	spezifische Aktivität $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$
<i>C. glutamicum</i>	N-His ₁₀ -PrpD1	$0,02 \pm 0,00$
<i>C. glutamicum</i>	N-His ₁₀ -PrpD2	$0,22 \pm 0,01$
<i>M. smegmatis</i>	N-His ₁₀ -MSMEG_6645	$0,05 \pm 0,00$
<i>E. coli</i>	PrpD	0,12

3.2 Kultivierung von *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt}-*prpD2*

Nachdem PrpD2 auf Grund der höchsten Citrat-Dehydratase-Aktivität als vielversprechendes Enzym zur Bereitstellung zusätzlicher Mengen *cis*-Aconitat identifiziert werden konnte, sollte es in Kombination mit dem CAD-Protein von *A. terreus* in *C. glutamicum* überproduziert werden. Dazu wurde das Plasmid pEKEx2-*cad*_{opt}-*prpD2* konstruiert (Material und Methoden 10.13) und in den Wildtyp-Stamm *C. glutamicum* eingebracht. Dieser wurde analog zu den ersten Produktionsversuchen in 60 ml mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose kultiviert. Dabei wurden das Wachstum und die finale Itaconat-Konzentration nach 72 h bestimmt (Abb. 12).

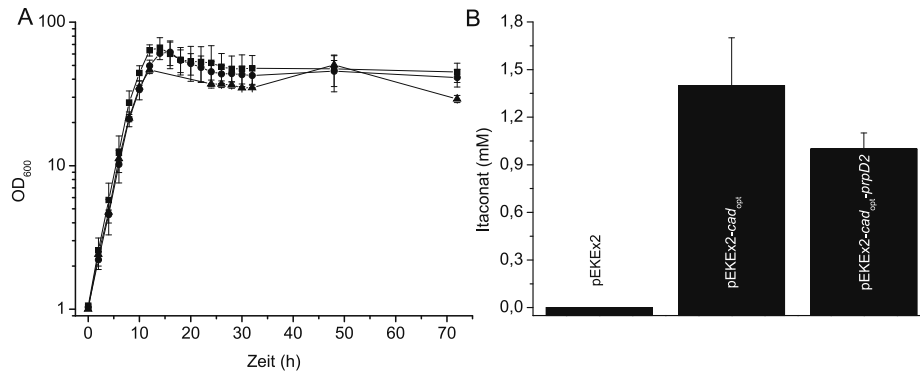


Abbildung 12: Wachstum (A) und finaler Itaconat-Titer (B) der Stämme *C. glutamicum*/pEKEx2 (■), *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} (●) und *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt}-*prpD2* (▲) in mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose, 25 µg ml⁻¹ Kanamycin und 0,5 mM IPTG. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten.

C. glutamicum/pEKEx2-*cad*_{opt}-*prpD2* zeigte die gleiche Wachstumsrate ($0,38 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$) wie der Stamm *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt}. Die Biomassebildung fiel mit $12,6 \pm 1 \text{ g (Btm)} \text{ l}^{-1}$ etwas niedriger aus als bei *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} ($15,5 \pm 3 \text{ g (Btm)} \text{ l}^{-1}$). Auch der Itaconat-Titer war mit 0,95 mM 32% geringer als bei *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt}.

3.3 Austausch der corynebacteriellen Aconitase gegen heterologe Aconitasen

Eine weitere Möglichkeit zur verbesserten *cis*-Aconitat-Bereitstellung lag im Austausch der *C. glutamicum*-Aconitase gegen eine heterologe Aconitase mit niedrigerer Affinität zu *cis*-Aconitat. Auf Grund der Tatsache, dass *A. terreus* mit dem CAD-Protein sehr hohe Itaconsäure-Titer erreichen kann, lag die Vermutung nahe, dass zumindest eine der drei putativen Aconitasen aus diesem Organismus möglicherweise eine niedrigere Affinität zu *cis*-Aconitat besitzt als die Aconitase aus *C. glutamicum* und für die bessere Itaconat-Bildung verantwortlich sein könnte. Daher sollte das Aconitase-Gen *acn* von *C. glutamicum* durch jeweils eines der drei putativen Aconitase-Gene *aco1*, *aco2* und *aco3* aus *A. terreus* ersetzt werden. Dies erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben (9.3). Der Austausch gegen *aco1* und *aco2* war erfolgreich, der Austausch gegen *aco3* dagegen nicht. Die resultierenden *C. glutamicum*-Stämme $\Delta acn::aco1$ und $\Delta acn::aco2$ wurden mit dem Produktionsplasmid pEKEx2-*cad*_{opt} transformiert und bezüglich Wachstum und Itaconat-Produktion getestet. Beide Stämme produzierten Itaconat ($1,3 \pm 0,0 \text{ mM}$ und $1,0 \pm 0,0 \text{ mM}$), jedoch mit deutlich

geringeren Produktionsraten als der Stamm *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} und wiesen einen ähnlich starken Wachstumsdefekt auf wie Δacn -Mutanten von *C. glutamicum* (Baumgart *et al.* 2011). Dies deutete darauf hin, dass die Expression von *aco1* und *aco2* nur zu einer sehr geringen Aconitase-Aktivität in *C. glutamicum* führte. Durch Supplementation des Mediums mit 5 mM Glutamat konnte das Wachstum jedoch bis auf eine OD₆₀₀ von 20 gesteigert werden. Die Itaconat-Produktion konnte durch das Einbringen der heterologen Aconitasen jedoch nicht gesteigert werden. In einem weiteren Versuch wurden die drei putativen *A. terreus* *acn*-Gene zusammen mit dem *cad*-Gen in dem Stamm *C. glutamicum* $\Delta acn::aco1$ exprimiert. Die resultierenden Stämme $\Delta acn::aco1$ /pEKEx2-*cad*_{opt}-*aco1* ($0,3 \pm 0,0$ mM), $\Delta acn::aco1$ /pEKEx2-*cad*_{opt}-*aco2* ($0,4 \pm 0,0$ mM) und $\Delta acn::aco1$ /pEKEx2-*cad*_{opt}-*aco3* ($0,4 \pm 0,1$ mM) produzierten jeweils weniger Itaconat als der Stamm *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt}. Der durch den *acn*-Austausch hervorgerufene Wachstumsdefekt von $\Delta acn::aco1$ konnte durch die plasmidbasierte Expression von *aco1*, jedoch nicht von *aco2* bzw. *aco3*, aufgehoben werden. Die Aconitase-Aktivität der rekombinanten Stämme wurde nicht bestimmt. Letztendlich konnte die Itaconat-Produktion durch Austausch von *acn* gegen *aco1* bzw. *aco2* aus *A. terreus* nicht gesteigert werden.

4 Steigerung der CAD-Aktivität mit Hilfe eines CAD-MalE-Fusionsproteins

Die Messung der CAD-Aktivität des Stammes *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} deutete darauf hin, dass neben der Bereitstellung des Substrats *cis*-Aconitat auch eine zu geringe CAD-Aktivität ein „bottleneck“ bei der Itaconat-Produktion darstellen könnte. Die CAD-Aktivität im Rohextrakt von *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} lag bei 56 ± 36 mU mg⁻¹ Protein, während sie bei der heterologen Überproduktion dieses Proteins in *S. cerevisiae* im Rohextrakt 276 ± 30 mU mg⁻¹ Protein (Kanamasa *et al.*, 2008) und bei der homologen Überproduktion in *A. terreus* 2100 mU mg⁻¹ Protein (Dwiarti *et al.*, 2002) erreichte. In der Annahme, dass die niedrige Aktivität im Rohextrakt auf eine sehr geringe CAD-Proteinstabilität oder auf eine Fehlfaltung des Proteins mit anschließender Degradation zurückzuführen sein könnte, wurden Versuche unternommen, das Protein zu stabilisieren. Zu diesem Zweck wurden zwei unabhängige Strategien gewählt. Zum einen sollte für die plasmidvermittelte Überproduktion die native „codon usage“ des *cad*-Gens verwendet werden, da diese auch in *A. terreus* seltene Codons beinhaltet, die für eine korrekte Proteinfaltung durch

verlangsamte Translation notwendig sein könnten (siehe Anhang 3). Zum anderen sollte CAD durch Fusion mit dem Maltosebindeprotein MalE aus *E. coli* stabilisiert werden. Analoge Versuche zeigten bei heterologen Proteinen eine deutlich verbesserte Protein-Produktion (Sun *et al.*, 2011).

Für die Nutzung der nativen Gensequenz wurde das *cad*-Gen ohne Veränderung der „codon usage“ erneut chemisch synthetisiert (Plasmid pMK-RQ-*cad*_{nat}) und das Plasmid pEKEx2-*cad*_{nat} (Material und Methoden 10.13) konstruiert. Um das Plasmid pEKEx2-*malEcad*_{opt} zu erhalten, das für das MalE-CAD-Fusionsprotein codiert, wurden die Gene *malE* und *cad*_{opt} sequenziell in den Vektor pEKEx2 kloniert (Material und Methoden 10.13).

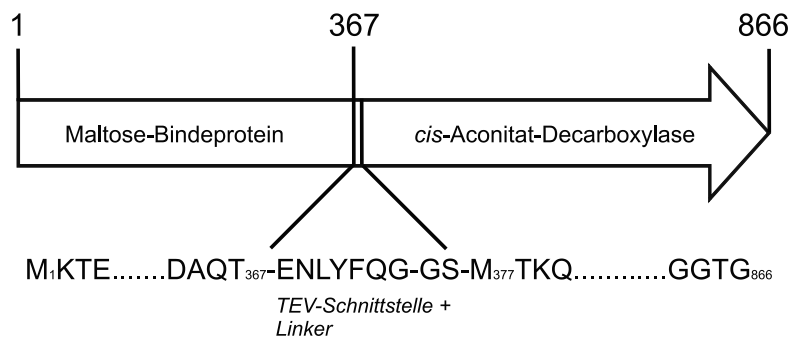


Abbildung 13: Primärstruktur des Fusionsproteins MalE-CAD. Zwischen der Sequenz des Maltose-Bindeproteins und der Sequenz des CAD-Proteins befinden sich eine TEV-Schnittstelle sowie ein Linker, der aus zwei Aminosäuren besteht.

Nach dem Transfer der Plasmide in *C. glutamicum* wurden die resultierenden Stämme *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{nat} und *C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt} bezüglich Wachstum, Itaconat-Produktion, Glucose-Aufnahme (Abbildung 14) und CAD-Aktivität analysiert. Als Referenzstämme dienten *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} sowie *C. glutamicum*/pEKEx2.

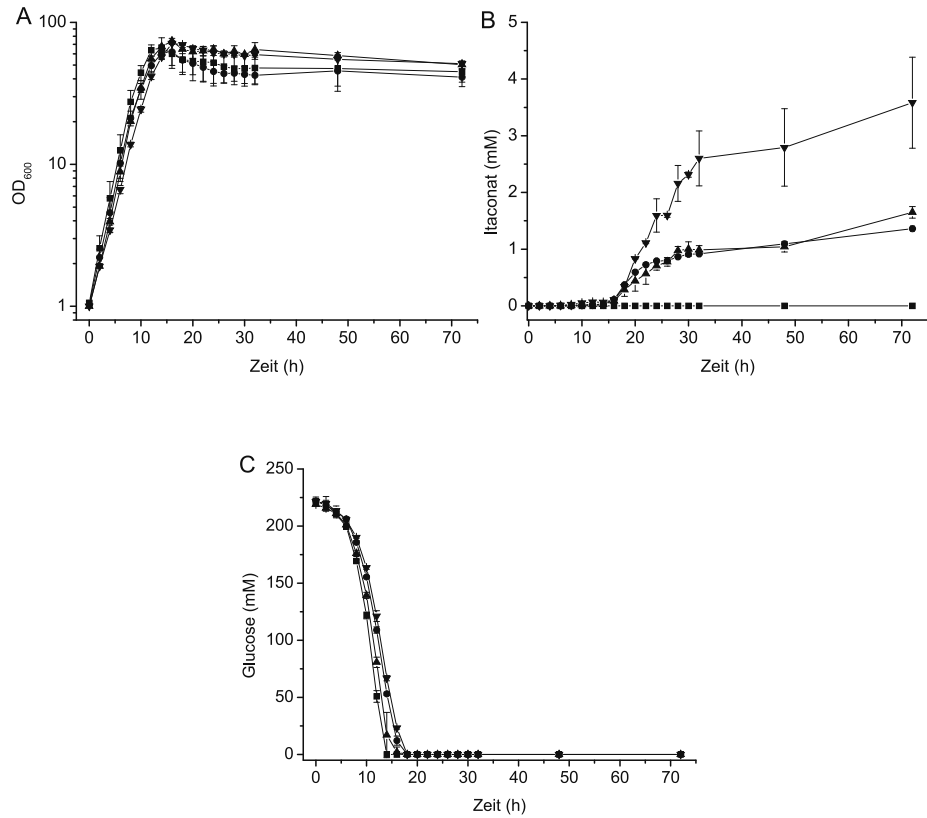


Abbildung 14: Wachstum (A), Itaconat-Produktion (B) und Glucose-Verbrauch der Stämme *C. glutamicum*/pEKEx2 (■), *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} (●), *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{nat} (▲) und *C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt} (▼) in mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose, 25 µg ml⁻¹ Kanamycin und 0,5 mM IPTG. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten.

Während *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{nat} ein dem Stamm *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} ähnliches Wachstumsverhalten zeigte, wies der Stamm *C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt} eine leicht reduzierte Wachstumsrate auf (Tab. 10). Die Itaconat-Produktion konnte von $1,4 \pm 0,3$ mM (*C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt}) auf $1,7 \pm 0,1$ mM (*C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{nat}) bzw. $3,6 \pm 0,8$ mM (*C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt}) gesteigert werden. Somit führte die Nutzung der nativen Gensequenz des *cad*-Gens nicht zu einer signifikanten Änderung bei der Itaconat-Bildung, während die Produktion mit Hilfe des MalE-CAD-Fusionsproteins mehr als verdoppelt werden konnte. Die Ausbeute stieg so von $0,006 \text{ mol mol}^{-1}$ (Itaconat/Glucose) auf $0,016 \text{ mol mol}^{-1}$ (Itaconat/Glucose). Die Itaconat-Produktionsphase war weiterhin an die

stationäre Phase gekoppelt. Die Itaconat-Konzentrationen korrelieren mit den gemessenen CAD-Aktivitäten der Rohextrakte (Tab. 11). Während der Rohextrakt mit dem CAD-Protein, das über die native Gen-Sequenz translatiert wurde, eine nahezu identische Aktivität aufwies, wie das Protein, das über die „codon usage“-optimierte Variante translatiert wurde, wies der Rohextrakt mit dem Fusionsprotein MalE-Cad_{opt} mit $134 \pm 56 \text{ mU mg}^{-1}$ eine deutlich erhöhte maximale Aktivität auf. Bereits nach 8 Stunden Kultivierung wurden erhöhte CAD-Aktivitäten gemessen ($48 \pm 19 \text{ mU mg}^{-1}$ Protein). Die Aktivitäten waren aber immer noch deutlich geringer als bei der heterologen Überproduktion von CAD in *S. cerevisiae*.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Wachstums- und Itaconat-Produktionseigenschaften von *C. glutamicum* ATCC 13032 mit verschiedenen Plasmiden.

Stamm <i>C. glutamicum</i> /	Wachstums- rate (h^{-1})	Biomasse g (Btm) l^{-1}	Glucose Verbraucht (mM)	Finaler Itaconat- Titer (mM)	Ausbeute Itaconsäure/ Glucose (mol mol^{-1})	Max. CAD- Aktivität mU mg^{-1} Protein
pEKEx2	0,41 + 0,01	16,5 ± 3	222 ± 3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
pEKEx2-cad _{opt}	0,38 + 0,01	15,5 ± 3	222 ± 2	1,4 ± 0,3	0,006	56 ± 36
pEKEx2-cad _{opt} - prpD2	0,38 + 0,01	12,6 ± 1	222 ± 2	1,0 ± 0,0	0,004	n.b.
pEKEx2-cad _{nat}	0,38 + 0,01	18,5 ± 1	219 ± 1	1,7 ± 0,1	0,008	59 ± 28
pEKEx2- malEcad _{opt}	0,33 + 0,01	17,5 ± 1	221 ± 4	3,6 ± 0,8	0,016	134 ± 56

Tabelle 11: Enzymaktivitäten des CAD-Proteins bei der Kultivierung der Stämme *C. glutamicum*/pEKEx2-cad_{opt}, *C. glutamicum*/pEKEx2-cad_{nat} und *C. glutamicum*/pEKEx2-malEcad_{opt} in mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose.

Stamm	Enzymaktivität (mU mg^{-1})			
	8 h	12 h	24 h	48 h
<i>C. glutamicum</i> /pEKEx2-cad _{opt}	10 ± 4	10 ± 3	38 ± 4	56 ± 36
<i>C. glutamicum</i> /pEKEx2-cad _{nat}	12 ± 3	7 ± 2	42 ± 21	59 ± 28
<i>C. glutamicum</i> /pEKEx2-malEcad _{opt}	48 ± 19	18 ± 4	85 ± 25	134 ± 56

5 Variation der Kultivierungsbedingungen für die Itaconat-Produktion

Während die beiden letzten Versuche durch molekulargenetische Methoden „bottlenecks“ auflösen sollten, wurde nun in den folgenden Versuchen ein prozessoptimierender Ansatz

ausgewählt. Bei den Versuchen mit den Itaconat-Produzenten der ersten und zweiten Generation zeigte sich, dass die Produktionsphase an die stationäre Phase gekoppelt ist. Zu diesem Zeitpunkt ist keine Glucose mehr im Medium vorhanden, die in Itaconat umgesetzt werden könnte. Um dieses Problem zu umgehen, wurden im Folgenden zwei verschiedene Strategien gewählt: (i) Nach Erreichen der stationären Phase wurden dem Medium Kohlenstoffquellen zugegeben, die als Substrat für die Itaconat-Bildung genutzt werden könnten. (ii) Durch Einführung einer Stickstofflimitierung sollte die Biomassebildung eingeschränkt werden, so dass bei Erreichen der stationären Phase noch Glucose im Medium vorlag.

5.1 Kohlenstoffpulseexperimente

Für die Kohlenstoffpulseexperimente wurde der Stamm *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} zunächst unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 12 Stunden, wenn die Glucose verbraucht war und die Itaconat-Produktion begann, wurde dem Medium je 50 mM Glucose, Na-Acetat, Ca-Propionat, Ca-Citrat oder Na-Laktat zugegeben und nach 48 Stunden die Itaconat-Konzentration im Überstand bestimmt (Tabelle 12). Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von Glucose, Citrat und Laktat einen positiven, die Zugabe von Acetat keinen und die Zugabe von Propionat einen negativen Effekt auf den finalen Itaconat-Titer hatte.

Tabelle 12: Finaler Itaconat-Titer des Stammes *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} in mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose und einem Kohlenstoffpuls nach 12 Stunden. Der Kohlenstoffpuls wurde mit 50 mM Glucose, Ca-Citrat, Na-Acetat, Ca-Propionat oder Na-Laktat durchgeführt.

<u>Itaconat-Titer nach 48 Stunden (mM)</u>					
Ohne Puls	Glucose	Citrat	Acetat	Propionat	Laktat
1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,1 ± 0,4	0,6 ± 0,0	1,4 ± 0,1

5.2 Stickstofflimitierung

Für die Experimente mit Stickstofflimitierung wurde die Stickstoffmenge berechnet, die zu einer Halbierung der Biomassebildung führen sollte. Dazu wurde dem mCGXII-Minimalmedium ausschließlich 1 g Harnstoff als Stickstoffquelle zugesetzt. Das standardmäßig verwendete mCGXII-Minimalmedium enthält zum Vergleich 5 g l⁻¹ Harnstoff und 5 g l⁻¹ Ammoniumsulfat. Die restlichen Komponenten im Medium und die Kultivierungsbedingungen blieben unverändert. Um die stickstofflimitierten Bedingungen zu testen, wurden die Stämme *C. glutamicum*/pEKEx2, *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt},

C. glutamicum/pEKEx2-*cad*_{nat} und *C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt} bezüglich Wachstum und Itaconat-Bildung analysiert (Abb. 15).

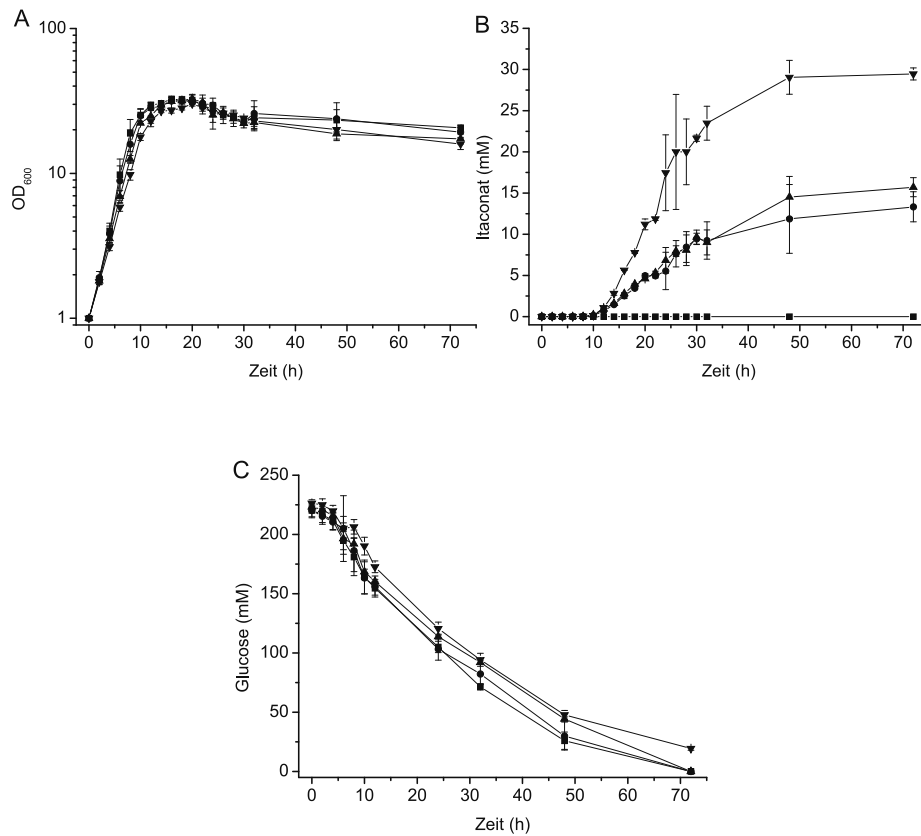


Abbildung 15: Wachstum (A), Itaconat-Produktion (B) und Glucose-Verbrauch (C) der Stämme *C. glutamicum*/pEKEx2 (■), *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} (●), *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{nat} (▲) und *C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt} (▼) in stickstofflimitiertem mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose, 25 µg ml⁻¹ Kanamycin und 0,5 mM IPTG. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten.

Die Stämme *C. glutamicum*/pEKEx2 ($0,36 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$), *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} ($0,34 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$), *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{nat} ($0,32 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$) und *C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt} ($0,28 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$) erreichten niedrigere Wachstumsraten als unter Standardbedingungen und hatten eine um ca. 50% reduzierte Biomassebildung (Abbildung 15A). Analog zur Wachstumsrate wurde auch eine reduzierte Glucoseaufnahme beobachtet.

Im Fall von *C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt} war diese soweit reduziert, dass nach 72 Stunden noch 19 ± 2 mM Glucose im Kulturüberstand messbar waren. Die Itaconat-Produktion konnte durch die Stickstofflimitierung deutlich gesteigert werden. Im Gegensatz zu den Standardbedingungen begann die Itaconat-Produktionsphase in allen Fällen bereits nach 8 Stunden und dauerte länger an. Der finale Itaconat-Titer konnte im besten Produktionsstamm (*C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt}) von $3,6 \pm 0,8$ mM auf $29,5 \pm 0,7$ mM gesteigert werden. Auch bei den Stämmen *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} und *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{nat} konnte eine Steigerung erzielt werden. Während Itaconat unter Standardbedingungen intrazellulär nicht nachweisbar war, also unter dem Detektionslimit der HPLC (0,0025 mM) lag, konnte der Metabolit unter stickstofflimitierten Bedingungen in den Zellen nachgewiesen werden (Tab. 13).

Tabelle 13: Intrazelluläre (int) und extrazelluläre (ext) Itaconat-Konzentrationen der Stämme *C. glutamicum*/pEKEx2, *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt}, *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{nat} und *C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt} während der Kultivierung unter stickstofflimitierenden Bedingungen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten.

Stamm					
<i>C. glutamicum</i> /	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
pEKEx2 (int)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
pEKEx2 (ext)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
pEKEx2- <i>cad</i> _{opt} (int)	<1	1 ± 0	6 ± 1	31 ± 3	93 ± 2
pEKEx2- <i>cad</i> _{opt} (ext)	<1	1 ± 0	6 ± 2	12 ± 4	13 ± 2
pEKEx2- <i>cad</i> _{nat} (int)	<1	1 ± 0	7 ± 1	33 ± 3	104 ± 4
pEKEx2- <i>cad</i> _{nat} (ext)	<1	1 ± 0	7 ± 2	15 ± 3	16 ± 1
pEKEx2- <i>malEcad</i> _{opt} (int)	0 ± 0	2 ± 0	11 ± 4	41 ± 1	49 ± 7
pEKEx2- <i>malEcad</i> _{opt} (ext)	<1	1 ± 0	17 ± 5	29 ± 2	30 ± 1

Während die intrazellulären Itaconat-Konzentrationen nach 8 und 12 Stunden noch sehr gering waren, stiegen sie nach 24 Stunden deutlich an. Nach 48 Stunden sind die intrazellulären Itaconat-Konzentrationen höher als die extrazellulären und nach 72 Stunden akkumuliert bis zu 100 mM Itaconat in den Stämmen *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt} und *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{nat}. Dies deutet darauf hin, dass Itaconat auch nach 48 Stunden weiter produziert, jedoch nicht mehr in dem Maß exportiert wurde, wie in der Hauptproduktionsphase.

Nachdem die Itaconat-Produktion durch die Stickstofflimitierung deutlich gesteigert werden konnte, wurde die Aktivität des CAD-Proteins im Rohextrakt bei diesen Kultivierungen überprüft. Überraschenderweise waren die CAD-Enzymaktivitäten bei allen drei Produktionsstämmen in Relation zu den Standardbedingungen deutlich erhöht. Genau wie bei den Standardbedingungen stieg die Aktivität während der Kultivierung kontinuierlich und hatte ein Maximum von $901 \pm 317 \text{ mU mg}^{-1} \text{ Protein}$ für den Stamm *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt}, von $820 \pm 377 \text{ mU mg}^{-1}$ für den Stamm *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{nat} und von $1446 \pm 419 \text{ mU mg}^{-1}$ für den Stamm *C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt}. Alle Wachstums- und Produktionsparameter der genutzten Stämme unter Stickstofflimitierung sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Wachstums- und Itaconat-Produktions-Parameter der Stämme *C. glutamicum*/pEKEx2, *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{opt}, *C. glutamicum*/pEKEx2-*cad*_{nat} und *C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt} bei Kultivierung in stickstofflimitiertem mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose.

Stamm <i>C. glutamicum</i>	Wachstums- rate (h^{-1})	Biomasse [g (Btm)l ⁻¹]	Glucose verbraucht (mM)	Glucose verbleibend (mM)	Finaler Itaconat- Titer (mM)	Ausbeute Itaconat/ Glucose (mol mol ⁻¹)	max. CAD Aktivität mU mg ⁻¹ Protein
pEKEx2	0,36 ± 0,03	8,2 ± 0,2	220 ± 6		0	0	0
pEKEx2- <i>cad</i> _{opt}	0,34 ± 0,03	7,9 ± 0,2	220 ± 5		13,3 ± 1,8	0,06	901 ± 317
pEKEx2- <i>cad</i> _{nat}	0,32 ± 0,01	8,2 ± 0,5	223 ± 1		15,7 ± 1,1	0,07	820 ± 377
pEKEx2- <i>malEcad</i> _{opt}	0,28 ± 0,01	7,6 ± 0,1	207 ± 1	19 ± 2	29,5 ± 0,7	0,14	1446 ± 419

6 Reduzierung der ICD-Aktivität zur Verbesserung der *cis*-Aconitat-Verfügbarkeit

Nachdem die Glucoseverfügbarkeit und die CAD-Enzymaktivität im Rohextrakt durch die Stickstofflimitierung deutlich gesteigert werden konnten, sollte in einem nächsten Schritt die Verfügbarkeit von *cis*-Aconitat erhöht werden, da dieser Metabolit die direkte Biosynthesestufe von Itaconat ist. Aus diesem Grund sollte der Kohlenstofffluss durch den Citrat-Zyklus so verändert werden, dass sich die Biosynthesestufen Citrat und *cis*-Aconitat anhäufen und mehr *cis*-Aconitat von CAD umgesetzt werden kann. Dazu sollte die Proteinmenge und damit auch die Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase (ICD) reduziert werden. Zu diesem Zweck wurden die Stämme *C. glutamicum-icd*(A1G) (AO-1) und *C. glutamicum-icd*(A1T) (AO-2) wie in Material und Methoden (9.3) beschrieben konstruiert, bei denen das ATG-Startcodon des *icd*-Gens gegen die seltenen Startcodons GTG bzw. TTG ausgetauscht wurde. Dieser Austausch sollte zu einer reduzierten Translationsinitiation der

icd-mRNA führen und damit zu einer reduzierten Bildung von ICD. Als Folge sollte der Kohlenstofffluss durch die ICD reduziert werden und dadurch höhere intrazelluläre Konzentrationen von Citrat, *cis*-Aconitat und Isocitrat vorliegen. Um die reduzierte ICD-Aktivität in den Stämmen AO-1 und AO-2 zu zeigen, wurden diese sowohl in Standard- als auch in stickstofflimitiertem mCGXII-Medium kultiviert und auf ihre ICD-Aktivität hin überprüft (Tabelle 15). Als Kontrolle wurde der Wildtypstamm ATCC 13032 verwendet. Die ICD-Aktivität konnte durch den Startcodonaustausch von einem ATG zu einem GTG von $0,94 \pm 0,01$ U mg⁻¹ Protein auf $0,19 \pm 0,01$ U mg⁻¹ reduziert werden. Der Austausch zu einem TTG als Startcodon führte zu einer Reduzierung der ICD-Aktivität auf $0,03 \pm 0,00$ U mg⁻¹ Protein. Dabei spielte es keine Rolle, ob der Enzymassay mit Zellen durchgeführt wurde, die unter Standardbedingungen oder stickstofflimitierten Bedingungen kultiviert worden waren.

Tabelle 15: Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität im Rohextrakt der Stämme *C. glutamicum* AO-1 und AO-2. Die Stämme wurden sowohl in Standard-mCGXII-Minimalmedium als auch in stickstofflimitiertem mCGXII-Minimalmedium kultiviert und bei einer OD₆₀₀ von 10 geerntet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten.

Stamm	Isocitrat-Dehydrogenase Aktivität (U mg ⁻¹)	
	Standard	N-limitiert
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	$0,94 \pm 0,01$	$0,95 \pm 0,02$
AO-1	$0,19 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,02$
AO-2	$0,03 \pm 0,00$	$0,04 \pm 0,00$

6.1 Analyse der Stämme mit reduzierter ICD-Aktivität

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Enzymaktivitäten der ICD durch den Startcodon-Austausch deutlich reduziert werden konnten, wurden die Stämme AO-1 und AO-2 mit dem besten Produktionsplasmid pEKEx2-*malEcad*_{opt} transformiert, unter stickstofflimitierten Bedingungen kultiviert und das Wachstum sowie die Itaconat-Produktion mit denen von *C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt} und *C. glutamicum*/pEKEx2 verglichen (Abb. 16 und Tab. 16).

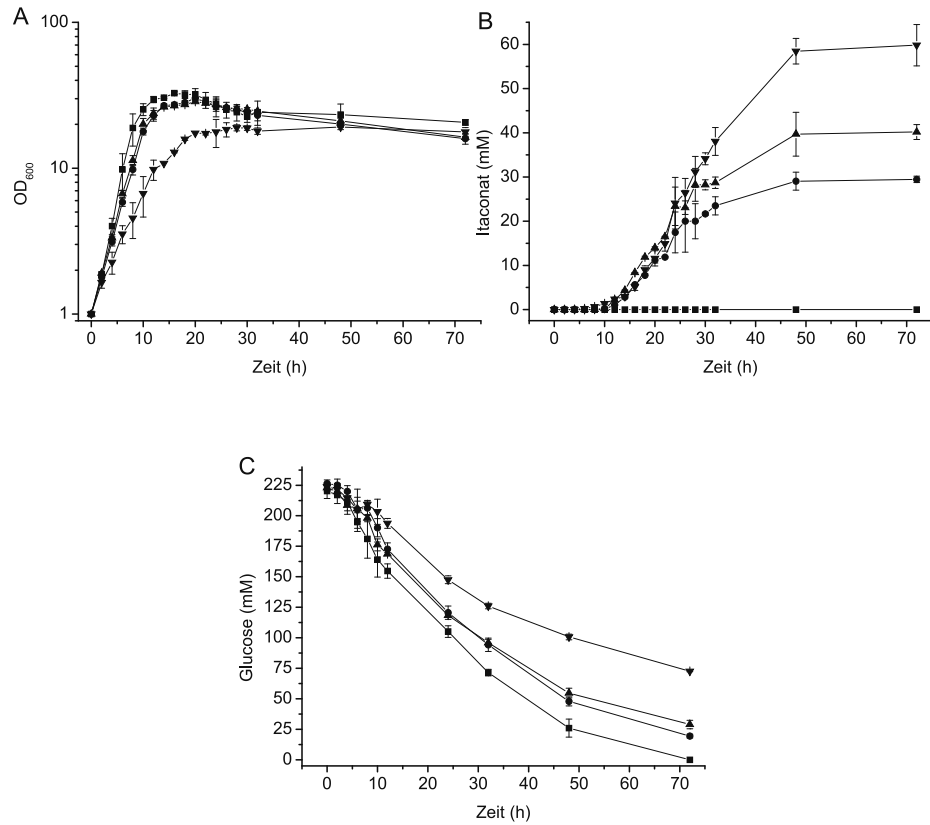


Abbildung 16: Wachstum (A), Itaconat-Produktion (B) und Glucose-Verbrauch (C) der Stämme *C. glutamicum*/pEKEx2 (■), *C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt} (●), AO-1/pEKEx2-*malEcad*_{opt} (▲) und AO-2/pEKEx2-*malEcad*_{opt} (▼) in stickstofflimitiertem mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose, 25 µg ml⁻¹ Kanamycin und 0,5 mM IPTG. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten.

Der Stamm AO-1/pEKEx2-*malEcad*_{opt} zeigte ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der Referenzstamm *C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt} ohne Startcodonaustausch (Abbildung 16A). Der Stamm AO-2/pEKEx2-*malEcad*_{opt} hingegen wies eine deutlich niedrigere Wachstumsrate auf und erreichte eine geringere Biomasse. Der finale Itaconat-Titer konnte von 30 mM (*C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt}) auf 40 mM (AO-1/pEKEx2-*malEcad*_{opt}) bzw. 60 mM (AO-2/pEKEx2-*malEcad*_{opt}) gesteigert werden, wobei fast die gesamte Menge bereits nach 48 Stunden vorlag (Abb. 16B). Im Medium des Stammes AO-2/pEKEx2-*malEcad*_{opt} konnte Itaconat bereits nach 6 Stunden detektiert werden, obwohl zu diesem Zeitpunkt die stationäre Phase noch lange nicht erreicht war. Die spezifische

Itaconat-Bildungsrate sank nach der Hauptproduktionsphase (12 h – 24 h) von $0,135 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (*C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt}) auf $0,074 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (24 h – 48 h). Der gleiche Effekt konnte auch für die Stämme AO-1/pEKEx2-*malEcad*_{opt} (von $0,189 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $0,130 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) und AO-2/pEKEx2-*malEcad*_{opt} (von $0,274 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $0,160 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) beobachtet werden. Auffällig ist, dass die Itaconat-Produktion bei allen drei Stämmen nach 48 Stunden nahezu stagnierte, obwohl noch Glucose im Medium vorhanden war. Bei AO-1/pEKEx2-*malEcad*_{opt} weist das Kulturmedium nach 72 Stunden noch 29 mM Glucose auf, bei der Kultivierung von AO-2/pEKEx2-*malEcad*_{opt} sogar 73 mM. Die intrazellulären Itaconat-Konzentrationen in diesen Stämmen nach 72 Stunden (100 mM) sind vergleichbar mit den bisher gemessenen Werten (vgl. Tab. 13) und übersteigen diese nicht. Die gemessenen CAD-Enzymaktivitäten zeigen jedoch noch einmal eine deutliche Steigerung der CAD-Aktivität im Rohextrakt. Im Stamm AO-1/pEKEx2-*malEcad*_{opt} konnten maximale CAD-Aktivitäten bis zu $2498 \pm 551 \text{ mU mg}^{-1}$ Protein gemessen werden. Diese Aktivität ist vergleichbar mit der Aktivität in *A. terreus* TNT-484. Im Stamm AO-2/pEKEx2-*malEcad*_{opt} konnten maximale Aktivitäten von $862 \pm 301 \text{ mU mg}^{-1}$ Protein gemessen werden. Alle gemessenen Wachstums- und Itaconat-Produktionsparameter sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Wachstums- und Itaconat-Produktionsparameter der Stämme *C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt}, AO-1/pEKEx2-*malEcad*_{opt} und AO-2/pEKEx2-*malEcad*_{opt} bei Kultivierung in stickstofflimitiertem mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose.

	<i>C. glutamicum</i> /pEKEx2- <i>malEcad</i> _{opt}	AO-1 /pEKEx2- <i>malEcad</i> _{opt}	AO-2 /pEKEx2- <i>malEcad</i> _{opt}
Wachstumsrate (h^{-1})	$0,28 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,03$
Biomasse [$\text{g (Btm)} \text{l}^{-1}$]	$7,6 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,2$
Glucose verbraucht (mM)	207 ± 1	194 ± 4	151 ± 4
Glucose verbleibend (mM)	19 ± 2	29 ± 4	73 ± 1
Finaler Itaconat-Titer (mM)	$29,5 \pm 0,7$	$40,2 \pm 1,7$	$59,8 \pm 4,7$
Ausbeute Itaconat/Glucose (mol mol^{-1})	0,14	0,21	0,4
Max. CAD-Aktivität (mU mg^{-1} Protein)	1446 ± 419	2498 ± 551	862 ± 301
Spez. Itaconat-Bildungsrate ($\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (12-24 h)	0,135	0,189	0,274
Spez. Itaconat-Bildungsrate ($\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (24-48 h)	0,074	0,130	0,160

7 Einfluss putativer Itaconat-Transporter aus *A. terreus* auf die Itaconat-Produktion mit *C. glutamicum*

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass die Itaconat-Produktion durch Erhöhung der Proteinstabilität und Reduzierung der Stickstoffverfügbarkeit verbessert werden konnte. Es blieb jedoch die Frage offen, wie und auf welche Weise Itaconat von *C. glutamicum* aus der Zelle transportiert wird. Die bisherigen Versuche haben verdeutlicht, dass Itaconat sowohl unter Standard- als auch unter stickstofflimitierenden Bedingungen aus der Zelle exportiert werden kann. Unter Stickstofflimitierung akkumulierte jedoch auch Itaconat innerhalb der Zelle und überstieg die extrazelluläre Itaconat-Konzentration bei weitem. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass der Itaconat-Export bei einer hohen intrazellulären Itaconat-Bildungsrate zu einem „bottleneck“ wird. Bisher sind keine Itaconat-Transporter in der Literatur beschrieben. Li *et al.* (2011) zeigten jedoch, dass eines der beiden benachbarten Gene des *cad*-Gens in *A. terreus* bei Transkriptomvergleichen von starken und weniger starken Itaconsäure-Produzenten einen erhöhten mRNA-Spiegel aufwies. Die beiden flussaufwärts und flussabwärts lokalisierten Gene, ATEG_09970 und ATEG_09972 sind als putative Transporter annotiert und könnten daher als spezifische Itaconsäure-Transporter fungieren. Eine Überexpression dieser Gene in *C. glutamicum* könnte die Exportlimitation möglicherweise aufheben. Daher wurden die beiden Gene chemisch synthetisiert und wie in Material und Methoden (9.3) beschrieben flussabwärts des *cad*-Gens in den Vektor pEKEx2-*cad_{opt}2* kloniert und in den Produktionsstamm AO-2 eingebracht. Das Plasmid pEKEx2-*malEcad_{opt}* konnte auf Grund der einzig verbleibenden Restriktions-Schnittstelle in der MCS nicht verwendet werden. In anschließenden Kultivierungen wurden das Wachstumsverhalten und die Itaconat-Produktion der resultierenden Stämme (AO-2/pEKEx2-*cad_{opt}*-ATEG_09970 und AO-2/pEKEx2-*cad_{opt}*-ATEG_09972) analysiert (Abb. 17).

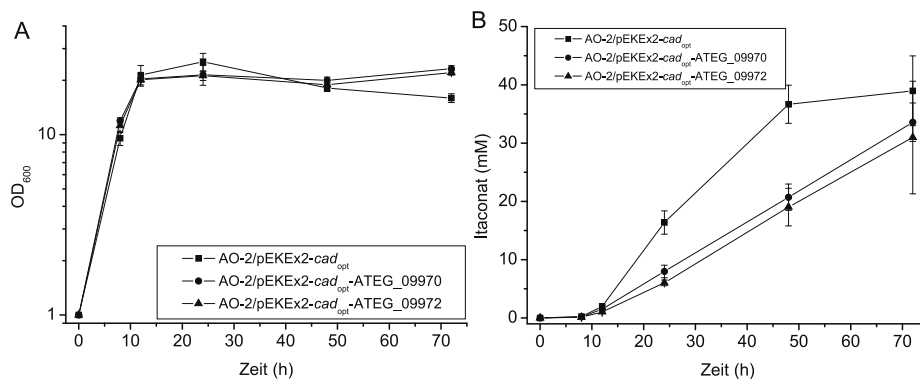


Abbildung 17: Wachstum (A) und Itaconat-Produktion (B) der *C. glutamicum*-Stämme AO-2/pEKEx2-*cad*_{opt}, AO-2/pEKEx2-*cad*_{opt}-ATEG_09970 und AO-2/pEKEx2-*cad*_{opt}-ATEG_09972 in stickstofflimitiertem mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose, 25 µg ml⁻¹ Kanamycin und 0,5 mM IPTG. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten.

Das Wachstumsverhalten der beiden neu generierten Stämme unterscheidet sich nur minimal von dem des Referenzstammes. In den ersten 8 Stunden wuchsen die Stämme AO-2/pEKEx2-*cad*_{opt}-ATEG_09970 und AO-2/pEKEx2-*cad*_{opt}-ATEG_09972 mit Wachstumsraten von $0,31 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ und $0,30 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, während der Referenzstamm eine Wachstumsrate von $0,28 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ zeigte. Während der Referenzstamm AO-2/pEKEx2-*cad*_{opt} $39,0 \pm 6,0 \text{ mM}$ Itaconat produzierte, akkumulierten die beiden Stämme mit den putativen Transportern nur $33,6 \pm 3,3 \text{ mM}$ (ATEG_09970) und $31,0 \pm 9,7 \text{ mM}$ (ATEG_09972) Itaconat im Überstand. Auffällig ist jedoch, dass die Itaconat-Bildungsrate im Überstand in Gegenwart der putativen Transportergene ab der 12. Stunde konstant ist, während sie im Referenzstamm (AO-2/pEKEx2-*cad*_{opt}) nach 48 Stunden nahezu auf 0 zurückgeht.

8 Versuche zur Itaconat-Produktion bei Kultivierung in Bioreaktoren

Alle bisher durchgeführten Versuche zur Itaconat-Produktion erfolgten ausnahmslos in Schüttelkolben und haben gezeigt, dass *C. glutamicum* in der Lage ist, Itaconat zu produzieren und bis zu 60 mM in das Kulturmedium zu exportieren. Um industrie-nähere Kultivierungsbedingungen zu testen und ggf. noch höhere Itaconat-Titer zu erreichen, sollte der beste Produktionsstamm AO-2/pEKEx2-*malEcad*_{opt} im Bioreaktor kultiviert werden. Dadurch kann das Kulturvolumen von 60 ml auf 600 ml erhöht und kontrollierte

Sauerstoffkonzentrationen und pH-Werte eingestellt werden, die möglicherweise zu einem besseren Produktionsergebnis führen. Die Kultivierungen wurden wie in Material und Methoden (7.3) beschrieben durchgeführt. Für den ersten Versuch wurden zwei Bedingungen gewählt (Abb. 18): (i) In der ersten Kultivierung wurde analog zu den stickstofflimitierten Bedingungen in den Schüttelkolbenexperimenten mCGXII-Minimalmedium mit 2,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (an Stelle von 1 g Harnstoff) und 4% (w/v) Glucose verwendet. Die Umstellung von Harnstoff auf Ammoniumsulfat erfolgte, weil der Harnstoff in Vorversuchen beim Autoklavieren ausgefallen war und so keine kontrollierte Stickstoffmenge im Medium vorhanden war. (ii) Durch die Verwendung von 6,6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 10% (w/v) Glucose sollten höhere optische Dichten erreicht werden, aber auch nach Erreichen der stationären Phase noch ausreichend Glucose für die Itaconat-Bildung zur Verfügung stehen.

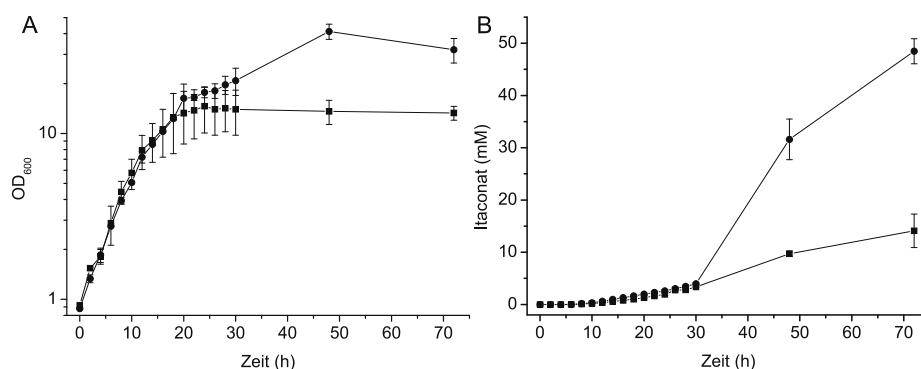


Abbildung 18: Wachstum (A) und Itaconat-Produktion (B) des Stammes AO-2/pEKEx2-*malEcad_{opt}* in 600 ml mCGXII-Minimalmedium pH 7,0 mit 2,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 4% (w/v) Glucose (■) und 6,6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 10% (w/v) Glucose (●) sowie 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin und 0,5 mM IPTG im Bioreaktor. Die Sauerstoffversorgung erfolgte durch Begasung mit 0,9 l min^{-1} Luft. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten.

Bei der Kultivierung im Bioreaktor wurde unter beiden Bedingungen mit $0,18 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ eine vergleichbare Wachstumsrate wie im Schüttelkolben erreicht. Die finale Biomasse bei der Kultivierung mit 2,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lag mit $3,3 \pm 0,1 \text{ g (Btm) l}^{-1}$ jedoch deutlich unter der im Schüttelkolben erreichten Biomasse ($4,8 \pm 0,2 \text{ g (Btm) l}^{-1}$). Die Itaconat-Produktion war ebenfalls deutlich reduziert. Während die Hauptproduktionsphase im Schüttelkolben bei Erreichen der stationären Phase begann, war bei der Kultivierung im Bioreaktor eine

gleichbleibend geringe Produktionsrate ab der 10. Stunde zu erkennen. Dies führte dazu, dass nach 72 Stunden unter stickstofflimitierten Bedingungen nur $14,1 \pm 3,2$ mM Itaconat gebildet worden waren. Im Fall der Kultivierung mit 10% (w/v) Glucose begann die Itaconat-Hauptproduktionsphase zwischen der 30. und der 48. Stunde. In 72 Stunden wurden $48,5 \pm 2,4$ mM Itaconat gebildet. Unter beiden Bedingungen konnten die in den Schüttelkolbenversuchen erreichten Itaconat-Titer von 60 mM nicht erreicht werden.

Da sich die Bedingungen von Bioreaktor und Schüttelkolben unterschieden, wurden im Folgenden bei den Kultivierungen (iii), (iv) und (v) verschiedene Parameter geändert. Statt Ammoniumsulfat wurde wieder auf Harnstoff zurückgegriffen und das Medium mit 5 g l^{-1} MOPS ergänzt. Durch die Zugabe von MOPS konnte das Ausfallen des Harnstoffs verhindert werden. Weiterhin wurden 10% (w/v) Glucose genutzt, weil dies im vorangegangenen Bioreaktorversuch zu einem höheren Itaconat-Titer geführt hatte. Zusätzlich wurde bei Kultivierung (iii) die Sauerstoffzufuhr durch Regulierung der Rührgeschwindigkeit nach Erreichen der stationären Phase erhöht. Bei Kultivierung (iv) wurde der Sauerstoffgehalt reduziert, in dem die Begasung von $0,9 \text{ l min}^{-1}$ auf $0,5 \text{ l min}^{-1}$ reduziert wurde und bei Kultivierung (v) wurde ein niedrigerer pH-Wert von 6,5 genutzt. Dieser sollte die Abnahme des pH-Wertes während der Versuche im Schüttelkolben simulieren (Abbildung 19). Bei den Kultivierungen (iii) und (iv) zeigte sich, dass eine erhöhte Sauerstoffzufuhr einen negativen Einfluss auf die Itaconat-Produktion hatte (Abb. 19B). In 72 Stunden wurden nur 45 mM Itaconat produziert. Die Sauerstofflimitierung hingegen hatte einen positiven Einfluss (Abb. 19B (iv)). In 72 Stunden konnten 80 mM Itaconat produziert werden, in 144 Stunden sogar 107 mM. Die Veränderung des pH-Wertes auf 6,5 hatte einen negativen Einfluss auf die Produktion, da nur 34 mM Itaconat akkumulierten (Abb. 19B (v)).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Sauerstofflimitierung einen positiven Einfluss auf die Itaconat-Produktion hatte, sollten vergleichbare Bedingungen zu den Versuchen mit Schüttelkolben unter stickstofflimitierten Bedingungen im Bioreaktor genutzt werden. Dazu wurde mCGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose und 1 g l^{-1} Harnstoff verwendet. Weiterhin wurde 5 g l^{-1} MOPS zugesetzt, so dass der Harnstoff nicht ausfiel. Für die Kultivierungen wurden zwei verschiedene Sauerstofflimitierungen verwendet. Bei Kultivierung (vi) wurde der Gehalt des gelösten Sauerstoffs im Medium durch Regulation der Rührgeschwindigkeit zwischen 10% und 40% gehalten. 100% gelöster Sauerstoff entspricht

dabei einer Konzentration von 235 μM . Bei Kultivierung (vii) wurde der Sauerstoffgehalt nach Erreichen der stationären Phase auf unter 10% reduziert (Abb. 20).

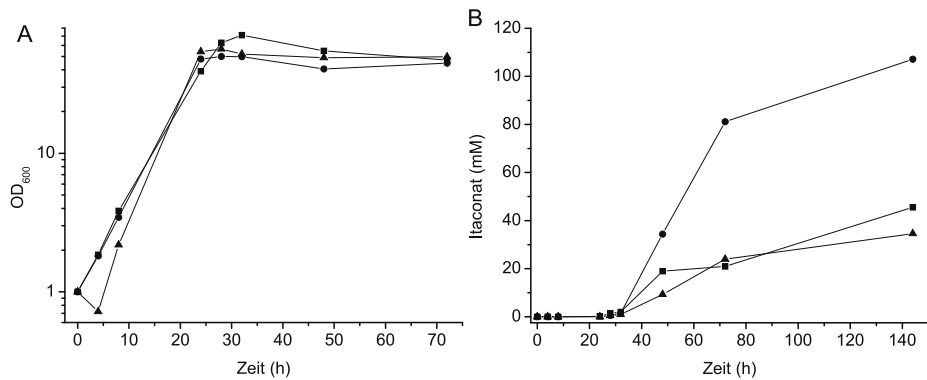


Abbildung 19: Wachstum (A) und Itaconat-Produktion (B) des Stammes AO-2/pEKEx2-*malEcad*_{opt} in 600 ml mCGXII-Minimalmedium pH 7,0 mit 10% (w/v) Glucose, 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin, 5 g l^{-1} Harnstoff, 5 g l^{-1} MOPS und 0,5 mM IPTG im Bioreaktor. (iii): DO >40% (■), (iv): DO <40% (●), (v): pH = 6,5 (▲).

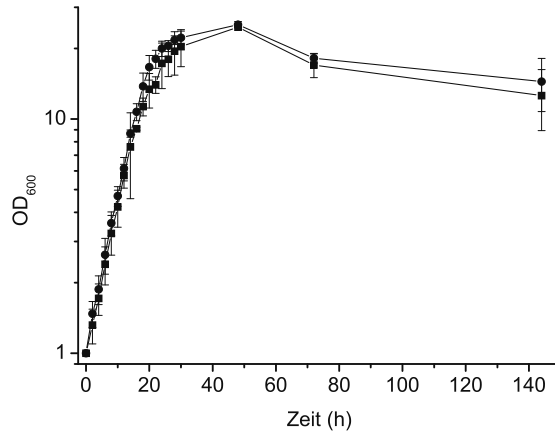


Abb. 20: Wachstum des Stammes AO-2/pEKEx2-*malEcad*_{opt} in 600 ml mCGXII-Minimalmedium pH 7,0 mit 4% (w/v) Glucose, 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin, 1 g l^{-1} Harnstoff, 5 g l^{-1} MOPS und 0,5 mM IPTG im Bioreaktor. (vi): DO < 40% > 10% (■); (vii): DO < 10% (●).

Die Kultivierungen (vi) und (vii) wurden in den ersten 30 Stunden unter identischen Bedingungen durchgeführt. Bei der ersten Bedingung wurde anschließend die Sauerstoffsättigung durch Reduzierung der Rührleistung von 800 auf 500 Upm limitiert und

auf einen Basiswert von unter 40% gelöstem Sauerstoff gebracht. Bei der zweiten Bedingung wurde der Rührer auf 200 Upm und die Begasung mit Luft auf $0,5 \text{ l min}^{-1}$ reduziert. Dies führte zu einer Sauerstoffsättigung von unter 10%. Die Itaconat-Produktion war bei der Kultivierung (vi) besser, da hier nach 72 Stunden $66 \pm 14 \text{ mM}$ Itaconat produziert werden konnten, während es bei der Kultivierung (vii) nur $15 \pm 1 \text{ mM}$ waren. Nach 144 Stunden wurden bei der ersten Bedingung sogar $112 \pm 26 \text{ mM}$ Itaconat nachgewiesen, bei der zweiten $30,4 \pm 6,3 \text{ mM}$. Weitere Messpunkte wurden bei dieser Kultivierung aus Zeitgründen nicht genommen.

VI Diskussion

In der weißen Biotechnologie wird das Wissen über biologische Verfahren, wie die Fermentation von Mikroorganismen oder enzymatische Prozesse genutzt, um Chemikalien aus erneuerbaren Rohstoffen wie Zucker oder Cellulose, herzustellen (Erickson *et al.*, 2012). Dabei wird angenommen, dass diese biotechnologisch hergestellten Bulkchemikalien im Allgemeinen „sauberer“ produziert werden können, weil sowohl Energie gespart als auch Treibhausgase reduziert werden können (Hermann *et al.*, 2007). Auch wenn zukünftig biotechnologische Prozesse entwickelt werden, bedeutet dies nicht, dass die chemischen Prozesse direkt ersetzt werden, da Investitionskosten für neue Apparaturen und der Wertverfall der bisherigen Maschinen dem entgegenstehen (Dornburg *et al.*, 2008). Der wichtigste Aspekt ist jedoch der Preis für die Rohmaterialien. Solange es „günstiges“ Rohöl gibt und die Preise für Zucker relativ hoch sind, bleibt der Markt für Bulkchemikalien aus erneuerbaren Rohstoffen begrenzt. Steigt der Rohölpreis weiterhin, wird der Markt für Produkte aus der weißen Biotechnologie immer größer und biobasierte Bulkchemikalien könnten durch die Entwicklung neuer und günstiger Prozesse traditionelle Verfahren ersetzen (Hermann und Patel, 2007; Dornburg *et al.*, 2008; Villela Filho *et al.*, 2011; Erickson *et al.*, 2012; Gallezot, 2012).

Auf Grund ihrer Vielseitigkeit stellt Itaconsäure eine vielversprechende Bulkchemikalie aus erneuerbaren Rohstoffen dar (Werpy und Petersen, 2004). Sie wird bereits biotechnologisch mit dem Pilz *Aspergillus terreus* hergestellt. Die Kosten für den Produktionsprozess sind jedoch vor allem durch teure Fermentationstechniken und die lange Produktionsdauer relativ hoch. Um alle möglichen Anwendungsgebiete der Itaconsäure nutzen zu können, müssten die Produktionskosten weiter sinken (Willke und Vorlop, 2001; Werpy und Petersen, 2004; Okabe *et al.*, 2009). Um dies zu erreichen, könnte zum einen der Produktionsprozess mit *A. terreus* optimiert oder die Itaconat-Produktion in einem einfach zu kultivierenden Mikroorganismus mit kürzerer Produktionszeit etabliert werden. *Corynebacterium glutamicum* könnte für diese Anwendung geeignet sein, da dieses Bakterium industriell für die großtechnische Produktion von Aminosäuren etabliert ist und auch eine Reihe organischer Säuren wie Succinat mit diesem Organismus effizient produziert werden können (Eggeling und Bott, 2005; Litsanov *et al.*, 2012a, b, c; Wieschalka *et al.*, 2012b).

1 *C. glutamicum* als Wirtsorganismus für die Itaconat-Produktion

Weil bisher nur Pilze und Hefen bekannt sind, die Itaconsäure natürlicherweise produzieren und sekretieren, bestand die Möglichkeit, dass das Bakterienwachstum durch diese Säure gehemmt wird und das Itaconat bzw. die Ansäuerung der Umgebung einen antibakteriellen Effekt ausübt. Dies könnte ein Mechanismus der Pilze und Hefen sein, um die eigenen Wachstumsbedingungen zu verbessern. Ein Indiz hierfür ist der inhibitorische Effekt der Itaconsäure auf verschiedene Enzyme. Dies wurde z.B. für die Isocitrat-Lyasen von *Pseudomonas indigofera* (McFadden und Purohit, 1977), *Tetrahymena pyriformis* (Dang and Cook, 1981), *C. glutamicum* (Reinscheid *et al.*, 1994) und *Mycobacterium tuberculosis* (Höner zu Bentrup *et al.*, 1999) gezeigt. Für *C. glutamicum* ist jedoch auch bekannt, dass die Isocitrat-Lyase bei Wachstum auf Glucose ohnehin nahezu keine Aktivität besitzt ($0,02 \text{ U mg}^{-1} \text{ Protein}$), während sie bei Wachstum auf Acetat als Kohlenstoffquelle ihre höchste Aktivität erreicht ($2,07 \text{ U mg}^{-1} \text{ Protein}$) (Gerstmeir *et al.*, 2003). Die Vorversuche zur Itaconat-Toleranz zeigten, dass das Wachstum von *C. glutamicum* nicht durch Itaconat beeinflusst wird und dass Itaconat nicht verstoffwechselt werden kann (Ergebnisteil 1). Unterstützt wird das Ergebnis auch dadurch, dass in *C. glutamicum* keine Enzyme bekannt sind, die Itaconat umsetzen können, so wie die Succinat-Citramalat-CoA-Transferase (EC 2.8.3.7) aus dem Organismus *Pseudomonas sp.*, welcher auf Itaconat als C-Quelle wachsen kann (Cooper und Kornberg 1964) oder die Succinyl-CoA:D-Citramalat-CoA-Transferase aus *Chloroflexus aurantiacus* (Friedmann *et al.*, 2006).

Expression des *cad*-Gens (Produktionsstamm der ersten Generation)

Der nächste Schritt bei der Entwicklung eines Itaconat-Produktionsstammes bestand in der Expression des „codon usage“-optimierten *cad*_{opt}-Gens. Dies führte zu einer Produktion von 1.4 mM Itaconat (vgl. Ergebnisteil 2.1). In einem vergleichbaren Versuch wurde kürzlich das *cad*-Gen auch in *Aspergillus niger* und *Escherichia coli* eingebracht (Li *et al.*, 2011). Die erreichten Itaconat-Konzentrationen lagen mit 5,4 mM (*A. niger*) und 0,6 mM (*E. coli*) in einem vergleichbaren Bereich. Der Einsatz verschiedener Promotoren für die *cad*-Expression zeigte zudem, dass die Produktionsmenge in *A. niger* auch von der Stärke des vorgeschalteten Promotors abhängig ist (Blumhoff *et al.*, 2012). Dennoch war die Produktion von Itaconat in dieser Menge überraschend, da *C. glutamicum* als Bakterium im Gegensatz zu allen natürlichen Itaconsäure-Produzenten keine Mitochondrien besitzt und es somit

keine räumliche Trennung zwischen der Aconitase-Reaktion und der CAD-Reaktion gibt. Diese könnte jedoch auf Grund der großen Diskrepanz zwischen den K_m -Werten zum Substrat *cis*-Aconitat (19 μ M für die Aconitase von *C. glutamicum* (Baumgart und Bott 2011); 2,45 mM für die CAD aus *A. terreus* (Dwiarti *et al.*, 2002)) notwendig sein. In den natürlichen Itaconsäure-Produzenten wie *A. terreus* und *U. maydis* gibt es zwar auch putative nicht-mitochondriale Aconitasen, diese wurden jedoch noch nicht charakterisiert. Auch die Kopplung der Itaconat-Produktion an die stationäre Wachstumsphase (vgl. Ergebnisteil 2.1) könnte ein Indiz dafür sein, dass die *cis*-Aconitat-Decarboxylase während der Wachstumsphase keine Möglichkeit hat, an ihr Substrat zu gelangen. Einen Hinweis darauf geben quantitative PCR-Daten, die zeigen, dass Gene des Citrat-Zyklus in der stationären Phase einen deutlich reduzierten mRNA-Spiegel zeigen (Han *et al.*, 2008). Die relativen Transkriptspiegel der Gene *icd* und *acn* sinken nach 10 bzw. 12 Stunden um den Faktor 2, gefolgt von *sucB* und *odhA* nach 14 bzw. 16 Stunden und *gltA* nach 17 Stunden. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass ein plötzlicher Wechsel des Mediums in der exponentiellen Phase zu einem Medium ohne Kohlenstoffquelle einen ähnlichen Effekt hat. (Han *et al.*, 2008). Entscheidend für den *in vivo* Kohlenstofffluss in der stationären Phase sind jedoch nicht die Transkriptlevel der Citrat-Zyklus Gene, sondern die Aktivitäten der dazugehörigen Proteine. Es wurde gezeigt, dass der *in vivo* Kohlenstofffluss durch den Citrat-Zyklus selbst bei einer Reduzierung der Citrat-Synthase Aktivität von 100% auf 10% durch Promotorautausch nur minimal abgesenkt wurde. Erst bei einer weiteren Reduzierung wird ein veränderter Fluss durch den Citrat-Zyklus vermutet (van Ooyen *et al.*, 2012).

Die Expression des Codon-Usage optimierten *cad*-Gens zeigte, dass die Produktion von Itaconat mit *C. glutamicum* prinzipiell möglich ist und dass dieser Organismus auf Grund seiner Itaconat-Toleranz und seiner Fähigkeit, Itaconat in Medium zu sekretieren, als Wirtsorganismus für die Itaconat-Produktion in Frage kommt.

Parallel zur Expression des *cad*-Gens wurde durch Sequenzvergleiche nach CAD-Homologen gesucht. Bisher ist die *cis*-Aconitat-Decarboxylase aus *A. terreus* das einzige bekannte Enzym, das Itaconat bilden kann, obwohl verschiedene andere Mikroorganismen bekannt sind, die Itaconsäure produzieren können, wie z.B. *U. maydis* oder *P. antarctica* (Tabuchi und Nakahara 1980; Tabuchi, 1981; Hashimoto *et al.*, 1989; Kawamura *et al.*, 1981; Levinson *et al.*, 2006). Bei der Suche nach CAD-Homologen (vgl. Anhang 2) konnten jedoch keine Proteine mit einer Sequenzidentität von mindestens 30% zu CAD aus *A. terreus* in den

Itaconsäure-produzierenden Organismen gefunden werden, deren Genome bereits sequenziert sind. Dazu gehören *Ustilago maydis* und die *Candida* Arten *C. glabrata* und *C. albicans*. Die größte Ähnlichkeit zu CAD besaß in diesen Organismen ein Protein das von dem ORF UM06344.1 aus *Ustilago maydis* codiert wird. Dieses Protein weist eine Sequenzidentität von 23% zu CAD auf und besitzt ebenfalls eine MmgE/PrpD Domäne. Dies lässt den Schluss zu, dass in diesen Organismen andere Enzyme, mit niedrigerer Sequenzidentität, Itaconsäure generieren. Möglicherweise ist in diesen Organismen auch ein anderer Biosyntheseweg vorhanden, bei dem Itaconat nicht durch die Decarboxylierung von *cis*-Aconitat entsteht, sondern beispielsweise über die Dehydrierung von 1,2,3-Tricarboxypropionsäure, so wie es auch für *Aspergillus terreus* zum Teil postuliert wurde (Bonnarme *et al.*, 1995). Die heterologe Überproduktion des Gens MSMEG_6856 aus *M. smegmatis*, das bei dem erwähnten Sequenzvergleich gefunden wurde, zeigte jedoch, dass dieses Protein keine CAD-Aktivität besitzt, weder *in vitro* noch *in vivo* (vgl. Ergebnisteil 2.1. und 2.2.).

cis-Aconitat-Verfügbarkeit

Der niedrige Itaconat-Titer von *C. glutamicum* mit pEKEx2-*cad*_{opt} ließ darauf schließen, dass ein „bottleneck“ bei der Produktion auftrat. Vor allem eine zu geringe Bereitstellung der Itaconat-Vorstufe *cis*-Aconitat war in diesem Zusammenhang sehr wahrscheinlich. Da neben der Aconitase keine weiteren Enzyme bekannt sind, die diesen Metaboliten herstellen können, wurden die 2-Methylcitrat-Dehydratasen PrpD1 und PrpD2 aus *C. glutamicum* sowie das Protein MSMEG_6645 aus *M. smegmatis* auf Citrat-Dehydratase-Aktivität hin getestet. In früheren Studien wurde gezeigt, dass 2-Methylcitrat-Dehydratasen mit sehr geringer Aktivität auch Citrat umsetzen können (Blank *et al.*, 2001; Brock *et al.*, 2002). Die Überproduktion von PrpD2 parallel zur *cis*-Aconitat-Decarboxylase führte jedoch zu einer Reduzierung des finalen Itaconat-Titers (vgl. Ergebnisteil 3.1). Die 2-Methylcitrat-Dehydratasen PrpD1 und PrpD2 aus *C. glutamicum* sind an der Verstoffwechselung von Propionsäure beteiligt und katalysieren die Umsetzung von 2-Methylcitrat zu 2-Methyl-*cis*-aconitat (Claes *et al.*, 2002; Hüser *et al.*, 2003; Plassmeier *et al.*, 2007). Der darauffolgende Schritt des 2-Methylcitrat-Zyklus, die Hydratisierung von 2-Methyl-*cis*-aconitat zu 2-Methylisocitrat wird von der Aconitase katalysiert (Plassmeier *et al.*, 2007). Während PrpD2 einen K_m -Wert von 2,12 mM für Citrat besitzt (Ergebnis nicht gezeigt), hat die

Aconitase einen K_m -Wert von 0,48 mM (Baumgart und Bott 2011). Die geringe *in vitro*-Aktivität von PrpD2 und die Konkurrenz mit der Aconitase um ihr natürliches Substrat (Citrat) haben somit wahrscheinlich dazu geführt, dass nicht mehr *cis*-Aconitat gebildet werden konnte. Die Expression von *prpD2* und *cad* in einer Δacn -Mutante könnte zeigen, ob dieser Ansatz überhaupt einen Effekt auf die Itaconat-Produktion haben könnte.

Ein weiterer Ansatz, um eine erhöhte Bereitstellung der Itaconat-Vorstufe *cis*-Aconitat zu erreichen, bestand darin, die *C. glutamicum* Aconitase gegen putative Aconitasen aus *A. terreus* auszutauschen (vgl. Ergebnisteil 3.3). Der Genaustausch führte bei den Genen *aco* (*aco1*) und ATEG_03325 (*aco2*) zu einem Wachstumsdefekt und einer reduzierten Itaconat-Produktion. In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass die Deletion der Gene *acn* und *icd*, zu Sekundärmutationen führt, die die Citratsynthase inaktivieren. Dies führte zu Wachstumsdefekten (Baumgart *et al.*, 2011). Bei diesem Experiment wurde das *acn*-Gen jedoch nicht klassisch deletiert, sondern in einem Schritt durch eine weitere putative Aconitase ersetzt. Dass es dennoch zu einem Wachstumsdefekt kam, kann daran liegen, dass die putativen Aconitasen aus *A. terreus* eine zu geringe oder gar keine Aktivität aufweisen. Die Aconitase-Aktivität von Aco1 und Aco2 konnte jedoch dadurch bestätigt werden, dass die Stämme mit diesen Aconitasen Itaconat bildeten und dies nur möglich ist, wenn eine Aconitase *cis*-Aconitat bereitstellt. Um die spezifische Aktivität der Aconitasen aus *A. terreus* zu bestätigen und einen genauer Einblick in die Biosynthese in diesem Organismus zu erhalten, sollten sie jedoch zukünftig überproduziert, gereinigt und charakterisiert werden.

CAD-Aktivität

Ein weiterer auffälliger Punkt bei der Analyse des ersten Produktionsstammes war die niedrige Aktivität der *cis*-Aconitat-Decarboxylase im Rohextrakt. Während die Aktivität bei *A. terreus* bei 2100 mU mg⁻¹ Protein (Dwiarti *et al.*, 2002) und bei der heterologen Überproduktion in *Saccharomyces cerevisiae* bei 276 mU mg⁻¹ Protein (Kanamasa *et al.*, 2008) lag, konnten im Rohextrakt von *C. glutamicum* nur maximale Aktivitäten von 56 ± 36 mU mg⁻¹ Protein gemessen werden (vgl. Ergebnisse Tab. 8). Dabei war die Enzymaktivität in der exponentiellen Wachstumsphase kaum messbar, während sie danach stetig anstieg. Der gleiche Effekt konnte auch in *A. terreus* beobachtet werden (Dwiarti *et al.*, 2002). Die niedrige CAD-Aktivität in *C. glutamicum* könnte also ein Grund für die niedrige Itaconat-Produktion sein. Verschiedene Faktoren, wie die Auswahl des richtigen Organismus,

der Kopienzahl des Plasmids, des Promotors, Transkription, Translation, mRNA-Stabilität, Translationssignale, die Wahl der Codon-Usage, sowie die Wahl von Temperatur und Wachstumsbedingungen, spielen bei der Aktivität eines Enzyms eine Rolle (Jana und Deb, 2005). Bei der *cis*-Aconitat-Decarboxylase könnte speziell die Bildung von Disulfidbrücken ein wichtiger Faktor sein. Mit dem Dipro-Algorithmus (Cheng *et al.*, 2006) wurde vorausgesagt, dass 8 von 12 Cysteinresten in der Primärsequenz des CAD-Proteins an der Bildung von Disulfidbrücken beteiligt und 4 weitere im aktiven Zentrum aktiv sein könnten (Kanamasa *et al.*, 2008). Dwiarti *et al.* zeigten bereits zuvor, dass CAD durch die Thiol-spezifischen Agenzien p-Chloromercuribenzoat, 5,5'-dithio-bis(2-Nitrobenzoat), Phenylhydrazin, ZnSO₄, CuSO₄ und HgCl₂ komplett inaktiviert wurde (Dwiarti *et al.*, 2002). Neben der Stabilisierung und der katalytischen Wirkung im aktiven Zentrum von Proteinen, können Cysteine auch regulatorische Funktionen und Metallbindefunktionen haben (Salinas *et al.*, 2011). Das endoplasmatische Reticulum, das in Pilzen und anderen Eukaryoten in erster Linie für die oxidative Proteinfaltung zuständig ist, fehlt in Bakterien (Sato und Inaba, 2012). Gram-negative Bakterien besitzen im Periplasma das Dsb-System, welches die Einführung von Disulfidbrücken steuern kann (Kadokura *et al.*, 2003; Dutton *et al.*, 2008). Obwohl auch in Gram-positiven Bakterien Dsb-ähnliche Proteine bekannt sind (Kouwen *et al.*, 2007) und kürzlich zwei sekretierte Disulfidbrücken-formende Enzyme in *C. glutamicum* gefunden worden sind (Daniels *et al.*, 2010), ist dennoch nur wenig darüber bekannt, wie Disulfidbrücken in *C. glutamicum* entstehen und vor allem, wie sie im oxidierten Zustand gehalten werden können. Somit könnten gerade bei der heterologen Überproduktion eines Proteins mit vier Disulfidbrücken Probleme bei der Faltung entstehen, die die Enzymstabilität einschränken.

Neben der Problematik bei der Bildung von Disulfidbrücken könnte auch die Optimierung der Codon-Usage des *cad*-Gens zu Problemen bei der Proteinfaltung geführt haben. Während im Wirtsorganismus *A. terreus* seltene Codons im *cad*-Gen auftreten (vgl. Anhang 3), waren alle Codons für *C. glutamicum* so optimiert, dass nur die häufigsten Codons genutzt wurden. In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, dass die Codon-Usage eines Gens einen Einfluss auf die homologe und heterologe Produktion von Proteinen hat und dass seltene Codons zu einer Reduzierung der Faltungs-Geschwindigkeit und dadurch zu einer besseren Proteinfaltung führen können (Kane, 1995; Makrides, 1996; Jana und Deb, 2005; Angov, 2011). Relativ neu ist jedoch der Ansatz der Harmonisierung der Codon-Usage

eines Gens. Dabei wird die relative Häufigkeit der Codons im nativen Wirt betrachtet und auf den heterologen Wirt übertragen (Angov *et al.*, 2008; Angov *et al.*, 2011). Fehlfaltung von Proteinen wird dabei vermieden, weil die Faltungsgeschwindigkeit nicht durch zu häufig oder zu selten genutzte Codons beeinflusst wird. Doch auch die Nutzung der nativen Gensequenz, welche einer Codon-Usage-Harmonisierung für *C. glutamicum* entsprach, führte nicht zu einer besseren CAD-Aktivität (Ergebnisteil 4.1 und Tab. 10)

Es ist zudem bekannt, dass die *cis*-Aconitat-Decarboxylase ein sehr instabiles Enzym ist (Bentley und Thiessen, 1955; Kanamasa *et al.*, 2008). Dazu passen sowohl die Beobachtungen zur niedrigen Aktivität als auch die Tatsache, dass das Protein trotz Überproduktion weder durch SDS-PAGE noch durch 2D-Gelelektrophorese in *C. glutamicum* identifiziert werden konnte. Aus diesem Grund lag ein weiterer Fokus in der Stabilisierung des CAD-Proteins durch einen stabilisierenden „Tag“. Bekannt für diese Funktion sind unter anderem Thioredoxin (LaVallie *et al.*, 2000), die Glutathion-S-Transferase (Smith und Johnson 1988), NusA (Davis *et al.*, 1999), sowie das Maltose-Bindeprotein (MBP) aus *E. coli*. (di Guan *et al.*, 1988). Weitere „Tags“ wurden in Reviews zusammengefasst (Terpe, 2003; Walls und Loughran, 2011). Für die Stabilisierung des CAD-Proteins wurde das Maltose-Bindeprotein aus *E. coli* gewählt, da verschiedenste Proteine auf diese Weise stabilisiert und vor allem eukaryotische Proteine heterolog überproduziert werden konnten (Pryor and Leitig, 1997; Sachdev und Chirgwin, 1998; Sachdev und Chirgwin, 1999; Kapust und Waugh, 1999). Mit Hilfe dieses oft als „Tag“ bezeichneten Proteins konnte die CAD-Aktivität im Zellextrakt von *C. glutamicum* von maximal 56 mU mg⁻¹ Protein auf 134 mU mg⁻¹ Protein gesteigert werden (vgl. Ergebnisteil 4.1). Die Erhöhung der Enzymaktivität spiegelte sich fast in gleichen Maßen in der Itaconat-Produktion wieder (von 1,4 mM auf 3,6 mM). Die Enzymaktivität der heterolog produzierten *cis*-Aconitat-Decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae* (276 mU mg⁻¹ Protein) konnte so jedoch nicht erreicht werden (Kanamasa *et al.*, 2008).

Glucoseverfügbarkeit

Um die Glucoseverfügbarkeit während der Itaconat-Produktionsphase zu gewährleisten wurden Experimente mit zusätzlichem Kohlenstoffpuls, der zwischen exponentieller und stationärer Phase gesetzt wurde, durchgeführt (vgl. Ergebnisteil 5.1). Diese haben gezeigt, dass die Zugabe von Glucose, Laktat und Citrat einen positiven Effekt auf die Produktion

hatte. Die Zugabe von Acetat hatte keinen, die Zugabe von Propionat einen negativen Effekt auf die Itaconat-Produktion. Dies kann dadurch erklärt werden, dass bei Wachstum auf Propionat die Gene der 2-Methylcitrat-Synthasen *prpC1* und *prpC2* stark hochreguliert sind und diese 2-Methylcitrat-Synthasen mit der Citrat-Synthase um das Substrat Oxalacetat konkurrieren. Dies führt dazu, dass in erster Linie der 2-Methylcitratcyclus durch Oxalacetat wieder aufgefüllt wird (Hüser *et al.*, 2003). Im Umkehrschluss bedeutet dies aber auch, dass das entstehende Oxalacetat nicht in den Citrat-Zyklus eingespeist wird und keine zusätzliche Kohlenstoffquelle für die Itaconat-Produktion bereitsteht. Für Acetat gilt dies nicht. Es wird zunächst zu Acetyl-CoA umgewandelt und in den Citrat-Zyklus eingespeist. Als anaplerotische Reaktion dient hierbei der Glyoxylatzyklus, der bei Wachstum auf Acetat aktiviert wird (Gerstmeir *et al.*, 2003). Wie bereits beschrieben, wird die Isocitrat-Lyase von *C. glutamicum* jedoch von Itaconat gehemmt (Reinscheid *et al.*, 1994), was zu einem Stopp bei der Acetat-Aufnahme geführt haben könnte. Ein Wachstum von *C. glutamicum* in Anwesenheit von Acetat und Itaconat könnte diese Frage zukünftig beantworten.

Auch bei den Versuchen mit stickstofflimitiertem mCGXII-Minimalmedium sollte ein kontinuierlicher Kohlenstofffluss durch Glykolyse und Citrat-Zyklus nach Erreichen der stationären Phase gewährleistet werden (vgl. Ergebnisteil 5.2). Auffällig war jedoch, dass sich die Glucoseaufnahme derart verlangsamte, dass auch nach 48 Stunden noch Glucose im Medium präsent war. In einer Studie von Doucette *et al.* (2011) wurde dieser Effekt ebenfalls bei stickstofflimitierten Bedingungen beobachtet, jedoch bei *E. coli*. Hier konnte ein direkter Zusammenhang zwischen α -Ketoglutarat, welches unter stickstofflimitierten Bedingungen vermehrt ausgeschieden wird und der Inhibierung von Enzym I des PTS-Systems gezeigt werden. Um einen solchen Zusammenhang auch in *C. glutamicum* zu bestätigen, müssen weitere Versuche durchgeführt werden. Eine Möglichkeit besteht darin, die Versuche unter Stickstofflimitierung zu wiederholen, dabei aber minimale Stickstoffpulse zu setzen, um die Kohlenstoffaufnahme wieder zu begünstigen. Auch die Nutzung von PTS-unabhängigen Glucose-Aufnahmesystemen könnte zukünftig hilfreich sein.

Die Itaconat-Produktion konnte unter stickstofflimitierten Bedingungen auf 30 mM (*C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad_{opt}*) gesteigert werden (Ergebnisteil Tabelle 14). Obwohl zunächst vermutet werden konnte, dass die reduzierte Glucoseaufnahme zu einer verbesserten Itaconat-Produktion geführt haben kann, zeigte sich, dass vor allem die Enzymaktivität der *cis*-Aconitat-Decarboxylase im Rohextrakt unter stickstofflimitierten

Bedingungen drastisch erhöht war (max. 1446 mU mg⁻¹ Protein). Dieser Anstieg in der Enzymaktivität erklärt somit die erhöhte Itaconat-Produktion. Die erste Annahme ist, dass das CAD-Protein unter diesen Bedingungen einen besseren Faltungsprozess durchläuft und somit mehr reifes und aktives Protein entsteht. Einen Hinweis für diese Theorie gaben Untersuchungen, bei denen die Transkriptome von Zellen, die unter Standardbedingungen und unter ammoniumlimitierten Bedingungen wuchsen, verglichen wurden (Silberbach *et al.*, 2005a). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Gene von Chaperonen, wie GroEL und GroES, unter ammoniumlimitierten Bedingungen hochreguliert waren, während auf der anderen Seite die Gene für Proteasen, wie *pepB*, NCgl0274, NCgl0440 und NCgl2737 herunterreguliert wurden und somit unter diesen Bedingungen eine Tendenz zur Proteinstabilisierung erkannt werden kann. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Gene, die in die Aminosäuresynthese involviert sind, unter stickstofflimitierten Bedingungen herunterreguliert waren, so dass ein unnötiger Verbrauch von Aminosäuren für die Proteinsynthese vermieden wurde (Silberbach *et al.*, 2005b). Für die Überproduktion der *cis*-Aconitat-Decarboxylase unter stickstofflimitierten Bedingungen könnten diese Ergebnisse bedeuten, dass gerade die Überproduktion von Chaperonen zur vermehrten Bildung von CAD-Protein beigetragen hat. Trotz der erhöhten Enzymaktivität im Rohextrakt konnte CAD auch unter diesen Bedingungen nicht durch SDS-PAGEs nachgewiesen werden.

Eine weitere Erklärung dafür, dass die CAD-Aktivität unter stickstofflimitierten Bedingungen erhöht ist, könnte auch der veränderte Fluss im Zentralstoffwechsel sein. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass unter Standardbedingungen Metabolite gebildet werden, die die *cis*-Aconitat-Decarboxylase inhibieren, während diese unter stickstofflimitierten Bedingungen nicht in diesem Ausmaß vorhanden sind. Dies würde erklären, warum die Enzymaktivität auch in *A. terreus* nicht konstant ist, sondern während der Kultivierung variiert (Dwiarti *et al.*, 2002). Um diese These zu bestätigen, müssten zukünftig weitere Enzymassays in Anwesenheit verschiedener Metabolite aus dem Zentralstoffwechsel von *C. glutamicum* durchgeführt werden.

2 Konstruktion und Analyse der Produktionsstämme der 2. und 3. Generation

Die Analyse des Produktionsstammes der 1. Generation zeigte, dass bestimmte „bottlenecks“ durch die Stabilisierung des CAD-Proteins und veränderte

Produktionsbedingungen geschlossen werden konnten. Dennoch war der finale Itaconat-Titer mit 30 mM noch weit von den erreichten Werten mit *A. terreus* entfernt (Yahiro *et al.*, 1995; Yahiro *et al.*, 1997; Kuenz *et al.*, 2012).

Um die *cis*-Aconitat-Verfügbarkeit weiter zu erhöhen sollte der Kohlenstofffluss hinter der Aconitase-Reaktion gestoppt bzw. gehemmt werden, so dass ein artifizierter „bottleneck“ entsteht und Citrat bzw. *cis*-Aconitat als Biosynthesestufen angehäuft werden. Durch Deletion des Isocitrat-Dehydrogenase-Gens *icd* würde der Kohlenstofffluss bei Isocitrat stoppen, so dass die Aconitase die reversible Umsetzung von Citrat zu Isocitrat immer wieder katalysieren könnte, bis die *cis*-Aconitat-Decarboxylase das auftretende Intermediat *cis*-Aconitat vollständig umgesetzt hat. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Deletion des *icd*-Gens zu Sekundärmutationen im Citratsynthase-Gen *gltA* führt, wodurch die Citratsynthase inaktiviert wird (Baumgart *et al.*, 2011). Aus diesem Grund sollte die Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase durch einen chromosomalen Startcodonaustausch lediglich reduziert werden (vgl. Ergebnisteil 6). In einem analogen Ansatz konnte auf diese Art und Weise die Lysinproduktion in *C. glutamicum* um 40% gesteigert werden (Becker *et al.*, 2009). Der Austausch des *icd*-Startcodons führte zu einer Steigerung des Itaconat-Titers von 30 mM (*C. glutamicum*/pEKEx2-*malEcad*_{opt}) auf 60 mM (AO-2/pEKEx2-*malEcad*_{opt}) (Ergebnisteil 6, Tabelle 15). Es ist anzunehmen, dass durch die reduzierte ICD-Aktivität der Kohlenstofffluss durch den TCA-Zyklus gehemmt wird (Becker *et al.*, 2009) und Citrat als Biosynthesestufe von Itaconat angehäuft wird. Dies setzt wie beschrieben voraus, dass die Enzymaktivität der Citratsynthase auf unter 10% ihrer maximalen Aktivität sinkt (van Ooyen *et al.*, 2012). Der Austausch des Startcodons des *icd*-Gens zu einem TTG stellt somit eine hervorragende Möglichkeit dar, den Kohlenstofffluss durch den TCA-Zyklus drastisch zu reduzieren, ohne aber den negativen Effekt, den eine Deletion des Gens (Baumgart *et al.*, 2011) mit sich bringt, hervorzurufen. In einem *C. glutamicum* Stamm mit chromosomal integriertem *cad*-Gen könnte eine Deletion des *icd*-Gens dennoch von Vorteil sein, weil im Gegensatz zum Wildtyp nicht Citrat, *cis*-Aconitat und Isocitrat angehäuft würden und somit nicht notwendigerweise Sekundärmutationen im *gltA*-Gen entstünden.

Putative Itaconat-Transporter

Die Analyse der intrazellulären Itaconat-Konzentrationen, der unter stickstofflimitierten Bedingungen kultivierten Produktionsstämme, deutete darauf hin, dass ein möglicher

Itaconat-Export nach der 48. Stunde limitiert ist (Ergebnisteil 5.2 Tabelle 13). Dies wirft zum einen die Frage auf, wie Itaconat in den ersten 48 Stunden aus der Zelle transportiert wird und zum anderen warum dieser Transport ab diesem Zeitpunkt gehemmt ist. Möglich ist, dass Itaconat über einen Transporter aus der Zelle transportiert wird, der als Hauptsubstrat einen anderen Metaboliten aus dem Citrat-Zyklus transportiert. Falls dieser nach 48 Stunden nicht weiter exprimiert wird, würde auch der Itaconat-Transport aufhören. Die Expression zweier putativer Itaconsäure-Transporter mit den Stämmen AO-2/pEKEx2-*cad*_{opt}-ATEG_09970 und AO-2/pEKEx2-*cad*_{opt}-ATEG_09972 zeigte, dass die Itaconat-Produktion in Relation zum Referenzstamm AO-2/pEKEx2-*cad*_{opt} nicht gesteigert werden konnte (vgl. Ergebnisteil 7). Bei längerer Kultivierungsdauer könnten die putativen Itaconat-Transporter jedoch einen positiven Effekt auf den finalen Itaconat-Titer haben, da die Itaconat-Bildung im Überstand ab der 12. Stunde konstant verlief, während sie bei den anderen Produktionsstämmen nach der 48. Stunde stark reduziert war. Um die Funktion der putativen Transporter zu testen, müssten weitere Analysen durchgeführt werden. Dazu gehört die Messung der internen Itaconat-Konzentration in diesen Stämmen sowie der Nachweis, ob die Transporterproteine gebildet werden. Deletionen dieser Gene im Produktionsstamm *A. terreus* könnten zudem zeigen, ob diese Gene für die Itaconat-Produktion notwendig und ob sie wirklich für den Transport von Itaconsäure verantwortlich sind. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, Transkriptomvergleiche mit den verschiedenen Itaconat-Produzenten von *C. glutamicum* durchzuführen, um den von *C. glutamicum* genutzten Transporter zu finden und diesen dann überzuproduzieren. Für die Anwesenheit eines solchen Transporters spricht die Tatsache, dass die Itaconat-Konzentration bei einem diffusionsabhängigen Transport intrazellulär und extrazellulär zu jedem Zeitpunkt identisch wäre und keine intrazelluläre Akkumulation nach der 48. Stunde stattfinden würde.

Der letzte Schritt bei der Analyse des besten *C. glutamicum* Itaconat-Produzenten AO-2/pEKEx2-*malEcad*_{opt} war der „Upscale“-Prozess. Dazu wurde der Produktionsmaßstab von 60 ml auf 600 ml erhöht und die Kultivierungsversuche in einem 1,4 l-Bioreaktor durchgeführt (vgl. Ergebnisteil 8). Die ersten Versuche haben gezeigt, dass einige der vielen veränderten Parameter, wie kontinuierlicher Sauerstofftransfer, pH-Wert-Kontrolle, unterschiedliche Mediumkomponenten oder das erhöhte Volumen, für die Reduzierung des Itaconat-Titers im Bioreaktor verantwortlich sein könnten (vgl. Ergebnisteil 8). Sie deuteten

aber auch darauf hin, dass eine Sauerstofflimitierung die Itaconat-Produktion positiv beeinflussen könnte. Die Reduzierung des im Medium gelösten Sauerstoffs führte zu einer erhöhten Itaconat-Produktion (vgl. Ergebnisteil 8, Abbildung 16). In 144 Stunden wurden so 107 mM Itaconat produziert. Mit diesem Wissen konnte nun ein Versuch durchgeführt werden, bei dem die Bedingungen aus den Schüttelkolbenversuchen so präzise wie möglich nachgestellt wurden. Hierbei wurde der Anteil des gelösten Sauerstoffs im Medium durch Reduzierung der Rührgeschwindigkeit und der Begasung mit Luft nach 30 Stunden reguliert. Es zeigte sich, dass ein zu hoher Anteil an gelöstem Sauerstoff (>40%) im Medium den Itaconat-Titer ebenso negativ beeinflussten wie ein zu niedriger Anteil (<10%) (vgl. Ergebnisteil 8). Mit Hilfe der „richtigen“ Sauerstoffkonzentration im Medium konnte jedoch im Bioreaktor ein vergleichbarer Itaconat-Titer erreicht werden wie im Schüttelkolben (66 mM im Bioreaktor, 60 mM im Schüttelkolben). Der genaue Zeitpunkt für eine Sauerstofflimitierung sowie die „richtige“ Sauerstoffkonzentration muss in weiteren Versuchen ermittelt werden. Dass eine Sauerstofflimitierung die Produktion positiv beeinflusst, war nicht zu erwarten, da Versuche mit *A. terreus* gezeigt haben, dass selbst kurze anaerobe Kultivierungsphasen die Biomasseproduktion hemmen und die Produktion von Itaconsäure irreversibel inhibiert wird (Willke und Vorlop, 2001). Kuenz *et al.* zeigten, dass sogar eine 10-minütige Unterbrechung des Schüttelns im Schüttelkolben dazu geführt hat, dass statt 65 g l⁻¹ Itaconsäure in 10 Tagen nur 23 g l⁻¹ Itaconsäure in 20 Tagen mit *A. terreus* produziert werden konnte und eine kontinuierliche Sauerstoffzufuhr daher absolut essentiell ist (Kuenz *et al.*, 2012). Dies lässt den Schluss zu, dass die notwendige Sauerstofflimitierung spezifisch für die Itaconat-Produktion mit *C. glutamicum* ist. Die „richtige“ Sauerstoffkonzentration könnte daher wichtig für die passende Geschwindigkeit des Kohlenstoffflusses durch den Zentralstoffwechsel sein, der für die Itaconat-Produktion notwendig ist. Stoffflussanalysen könnten bei der Entwicklung eines optimierten Prozesses helfen.

3 Schlussfolgerung und Perspektive

In dieser Arbeit wurden *C. glutamicum*-Stämme generiert, die durch „metabolic engineering“ die Fähigkeit erhielten, Itaconat zu produzieren. Dadurch wurde *C. glutamicum* als erster bakterieller Itaconat-Produzent, der mit den bestehenden Produktionsprozessen

konkurrieren kann, etabliert. Letzten Endes führte die Überproduktion eines Fusionsproteins, einer Kombination aus Maltose-Bindeprotein und *cis*-Aconitat-Decarboxylase, zusammen mit einem Startcodon-Austausch des *icd*-Gens und stickstofflimitierten Kultivierungsbedingungen zu dem besten Produktionsstamm (AO-2/pEKEx2-*malEcad_{opt}*). Tabelle 17 zeigt einen Vergleich der Produktionsparameter dieses Stammes mit denen von in der Literatur publizierten *A. terreus*-Stämmen.

Tabelle 17: Vergleich von verschiedenen Itaconsäure-Produktionsstämmen. Für *C. glutamicum* sind die Produktionsparameter des Stammes AO-2/pEKEx2-*malEcad_{opt}* angegeben.

Organismus	finaler Titer (mM)	Dauer (Tage)	Ausbeute Itaconat/ Glucose (mol mol ⁻¹)	spezifische Itaconat-Produktions- rate (g l ⁻¹ h ⁻¹)	Referenz
<i>A. terreus</i>	630	6	0,75	0,57	Yahiro <i>et al.</i> , 1995
<i>A. terreus</i>	490	4	o. A.	0,64	Yahiro <i>et al.</i> , 1997
<i>A. terreus</i>	660	7	0,87	0,51	Kuenz <i>et al.</i> , 2012
<i>C. glutamicum</i>	60	2 (3)*	0,4	0,27**	Diese Arbeit

*die Itaconat-Produktion war nach 2 Tagen nahezu abgeschlossen.

**die maximale Produktionsrate zwischen der 12. und der 24. Stunde.

Auch wenn die Itaconat-Produktion mit *C. glutamicum* noch nicht das Niveau von *A. terreus* erreicht, zeigt sich, dass dieser Organismus durchaus konkurrenzfähig ist und weiteres Entwicklungspotential besitzt. Der finale Itaconat-Titer beträgt bisher nur knapp ein Zehntel von dem in *A. terreus* erreichten. Legt man jedoch die Produktionsdauer zu Grunde und kalkuliert diese für 7 Tage, könnten mit *C. glutamicum* bereits 210 mM Itaconat gebildet werden. Ansatzpunkte für die weitere Optimierung der Itaconat-Produktion mit *C. glutamicum* sind die weitere Optimierung der allgemeinen Prozessparameter bei der Kultivierung, die Erhöhung der Zelldichte zur Optimierung der Itaconat-Produktionsrate, die Verbesserung der *cis*-Aconitat-Verfügbarkeit und die Suche nach einem Itaconat-Exporter. Zudem sollten die aufgetretenen Fragen beantwortet werden, warum die CAD-Aktivität im Rohextrakt unter den verschiedenen Bedingungen so divergiert, warum die restliche Glucose im Medium nicht mehr verstoffwechselt wird und warum die Itaconat-Exportrate nach 48 Stunden sinkt. Im Vergleich zu *A. terreus* hat *C. glutamicum* den Vorteil, dass der Zentralstoffwechsel bereits sehr gut untersucht worden und „metabolic engineering“

einfach durchzuführen ist. Bei der Aufarbeitung der Itaconsäure hat die Produktion mit *A. terreus* allerdings den Vorteil, dass die Zellen nur abfiltriert werden müssen, die Säure auf 350 g l^{-1} aufkonzentriert und bei 15°C kristallisiert wird. Bei *C. glutamicum* liegt die Säure auf Grund des pH-Wertes bei der Kultivierung in Form des Kaliumsalzes vor, wodurch weitere Aufreinigungskosten entstehen. Hierbei müsste sich zukünftig zeigen, ob sich die entstehenden Zusatzkosten durch Erreichen höherer Itaconat-Titer rentieren würden.

VII Literaturverzeichnis

Abe, S., K. Takayama und S. Kinoshita (1967). "Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria." Appl Microbiol Biotechnol **13**: 279-301.

Ahmann, D. und J. R. Dorgan (2007). Bioengineering for Pollution Prevention through Development of Biobased Energy and Materials: State of the Science Report, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Center for Environmental Research, Jan. 2007. EPA/600/R-01/028.

Al-Husseini, M. (2006). "The debate over Hubbert's Peak: a review." GeoArabia **11**(2).

Angov, E. (2011). "Codon usage: nature's roadmap to expression and folding of proteins." Biotechnol J **6**(6): 650-659.

Angov, E., C. J. Hillier, R. L. Kincaid und J. A. Lyon (2008). "Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host." PLoS One **3**(5): e2189.

Angov, E., P. M. Legler und R. M. Mease (2011). "Adjustment of codon usage frequencies by codon harmonization improves protein expression and folding." Methods Mol Biol **705**: 1-13.

Baumgart, M. und M. Bott (2011). "Biochemical characterisation of aconitase from *Corynebacterium glutamicum*." J Biotechnol **154**(2-3): 163-170.

Baumgart, M., N. Mustafi, A. Krug und M. Bott (2011). "Deletion of the aconitase gene in *Corynebacterium glutamicum* causes strong selection pressure for secondary mutations inactivating citrate synthase." J Bacteriol **193**(24): 6864-6873.

Baup, S. (1837). "Über eine neue Pyrogen-Citronensäure und über Benennung der Pyrogen-Säuren überhaupt." Ann Chim Phys **19**: 29-38.

Becker, J., C. Klopprogge, H. Schröder und C. Wittmann (2009). "Metabolic engineering of the tricarboxylic acid cycle for improved lysine production by *Corynebacterium glutamicum*." Appl Environ Microbiol **75**(24): 7866-7869.

Bentley, R. und C. P. Thiessen (1955). "*Cis*-aconitic decarboxylase." Science **122**(3164): 330.

Bentley, R. und C. P. Thiessen (1957a). "Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*. I. Tracer studies with C¹⁴-labeled substrates." J Biol Chem **226**(2): 673-687.

Bentley, R. und C. P. Thiessen (1957b). "Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*. II. Early stages in glucose dissimilation and the role of citrate." J Biol Chem **226**(2): 689-701.

Bentley, R. und C. P. Thiessen (1957c). "Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*. III. The properties and reaction mechanism of *cis*-aconitic acid decarboxylase." J Biol Chem **226**(2): 703-720.

Berg, R. G. und D. S. Hetzel (1978). Preparation of citraconic anhydride. **US-Patent 4 100 179 (to Pfizer)**

Blank, L., J. Green und J. R. Guest (2002). "AcnC of *Escherichia coli* is a 2-methylcitrate dehydratase (PrpD) that can use citrate and isocitrate as substrates." Microbiology **148**(Pt 1): 133-146.

Blatt, A. H. (1943). Organic synthesis, Wiley, New York. **2**: 328.

Blombach, B., T. Riester, S. Wieschalka, C. Ziert, Y. W. Yuon, V. F. Wendisch und B. J. Eikmanns (2011). "*Corynebacterium glutamicum* tailored for efficient isobutanol production." Appl Environ Microbiol **77**(10): 3300-3310.

Blombach, B., M. E. Schreiner, T. Bartek, M. Oldiges und B. J. Eikmanns (2008). "*Corynebacterium glutamicum* tailored for high-yield L-valine production." Appl Microbiol Biotechnol **79**(3): 471-479.

- Blumhoff, M., M. G. Steiger, H. Marx, D. Mattanovich und M. Sauer (2012). "Six novel constitutive promoters for metabolic engineering of *Aspergillus niger*." Appl Microbiol Biotechnol.
- Bonnarme, P., B. Gillet, A. M. Sepulchre, C. Role, J. C. Beloeil und C. Ducrocq (1995). "Itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*." J Bacteriol **177**(12): 3573-3578.
- Bookout, J. F. (1989). "Two centuries of fossil fuel energy." Episodes v. **12**(no. 4): 257-262.
- BP (2012). "BP Statistical Review of World Energy June 2012." bp.com/statisticalreview
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brock, M., C. Maerker, A. Schutz, U. Volker und W. Buckel (2002). "Oxidation of propionate to pyruvate in *Escherichia coli*. Involvement of methylcitrate dehydratase and aconitase." Eur J Biochem **269**(24): 6184-6194.
- Brocker, M., S. Schaffer, C. Mack und M. Bott (2009). "Citrate utilization by *Corynebacterium glutamicum* is controlled by CitAB two-component system through positive regulation of the citrate transport genes *citH* and *tctCBA*." J Bacteriol **191** (12): 3869-3880.
- Burkovski, A. (2008). Corynebacteria: Genomics and Molecular Biology. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Bussmann, M., M. Baumgart und M. Bott (2010). "RosR (Cg1324), a hydrogen peroxide-sensitive MarR-type transcriptional regulator of *Corynebacterium glutamicum*." J Biol Chem **285**(38): 29305-29318.
- Calam, C. T., A. Oxford und H. Raistrick (1939). "Itaconic Acid, A Metabolic Product of a Strain of *Aspergillus terreus* Thom." Biochem. J **33**(1488).
- Campbell, C. J. und J. H. Laherrere (1998). "The end of cheap oil." Scientific American **278**(3): 78-83.
- Carpinelli, J., R. Kramer und E. Agosin (2006). "Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for trehalose overproduction: role of the TreYZ trehalose biosynthetic pathway." Appl Environ Microbiol **72**(3): 1949-1955.
- Cheng, J., H. Saigo und P. Baldi (2006). "Large-scale prediction of disulphide bridges using kernel methods, two-dimensional recursive neural networks, and weighted graph matching." Proteins **62**(3): 617-629.
- Chiusoli, G. P. (1962). Process for preparing itaconic acid and 2,3-butandienoic acid. **US-Patent 3 025 320 (to Montecatini, Italy)**
- Christiansen, A. (1980). Surface active amide and amideazolines. **GB Patent 1,574,916 (to Miranol Chemical)**
- Claes, W. A., A. Pühler und J. Kalinowski (2002). "Identification of two *prpDBC* gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle." J Bacteriol **184**(10): 2728-2739.
- Cooper, R. A. und H. L. Kornberg (1964). "The utilization of itaconate by *Pseudomonas sp.*" Biochem J **91**(1): 82-91.
- Corzo, R. H. und E. L. Tatum (1953). "Biosynthesis of itaconic acid." Federation Proceedings **12**: 470.
- Culbertson, B. M. (2006). "New polymeric materials for use in glass-ionomer cements." J Dent **34**: 556-565.
- Dang, A. Q. und D. E. Cook (1981). "Itaconic acid: An Inhibitor of Isocitrate Lyase in *Tetrahymena pyriformis* in vitro and in vivo." Biochemica et Biophysica Acta **678**: 316-321.
- Daniels, R., P. Mellroth, A. Bernsel, F. Neiers, S. Normark, G. von Heijne und B. Henriques-Normark (2010). "Disulfide bond formation and cysteine exclusion in gram-positive bacteria." J Biol Chem **285**(5): 3300-3309.
- Davis, G. D., C. Elisee, D. Newham und R. G. Harrison (1999). "New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*." Biotechnol Bioeng **65**(4): 382-388.

- De, T. K., E. J. Bergey, S. J. Chung, D. J. Rodman, D. J. Bharali und P. N. Prasad (2004). "Polycarboxylic acid nanoparticles for ophtalmic drug delivery: an ex vivo evaluation with human cornea." J Microencapsul **21**: 841-855.
- di Guan, C., P. Li, P. Riggs und H. Inouye (1988). "Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein." Gene **67**(1): 21-30.
- Dornburg, V., B. G. Hermann und M. K. Patel (2008). "Scenario projections for future market potentials of biobased bulk chemicals." Environ Sci Technol **42**(7): 2261-2267.
- Doucette, C. D., D. J. Schwab, N. S. Wingreen und J. D. Rabinowitz (2011). "alpha-Ketoglutarate coordinates carbon and nitrogen utilization via enzyme I inhibition." Nat Chem Biol **7**(12): 894-901.
- Du, J., Z. Shao und H. Zhao (2011). "Engineering microbial factories for synthesis of value-added products." J Ind Microbial Biotechnol. **38** (8): 873-890.
- Dutton, R. J., D. Boyd, M. Berkman und J. Beckwith (2008). "Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(33): 11933-11938.
- Dwiarti, L., K. Yamane, H. Yamatani, P. Kahar und M. Okabe (2002). "Purification and characterization of *cis*-aconitic acid decarboxylase from *Aspergillus terreus* TN484-M1." J Biosci Bioeng **94**(1): 29-33.
- Ebbinghausen, H., B. Weil und R. Krämer (1989). "Isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*: evidence for a specific efflux carrier system." Appl Microbiol Biotechnol **31**: 184-190.
- Edwards, J. D. (1997). "Crude oil and alternate energy production forecasts for the twenty-first century: the end of the hydrocarbon era." American Association of Petroleum Geologists Bulletin **81**(8): 1292-1305.
- Eggeling, L. und M. Bott (2005). Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Eikmanns, B. J., E. Kleinertz, W. Liebl und H. Sahm (1991). "A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing." Gene **102**: 93-98.
- Eikmanns, B. J., D. Rittmann und H. Sahm (1995). „Cloning, sequence analysis, expression, and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum* *icd* gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme.“ J Biotechnol **177**(3): 774-782
- Ellis, E. J., A. P. Olson und J. R. Bonafini (1994). Improves itaconate copolymeric compositions for contact lenses. **WO-Patent 9 423 314**
- Erickson, B., Nelson und P. Winters (2012). "Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals." Biotechnol J **7**(2): 176-185.
- Ferraboschi, P., S. Casati, P. Grisenti und E. Santaniello (1994). "Selective enzymatic transformations of itaconic acid derivatives: An access to potentially useful building blocks." Tetrahedron **50**: 3251-3258.
- Friedmann, S., B. E. Alber und G. Fuchs (2006). "Properties of succinyl-coenzyme A:D-citramalate coenzyme A transferase and its role in the autotrophic 3-hydroxypropionate cycle of *Chloroflexus aurantiacus*." J Bacteriol **188**(18): 6460-6468.
- Gallezot, P. (2012). "Conversion of biomass to selected chemical products." Chem Soc Rev **41**(4): 1538-1558.
- Gerstmeir, R., V. F. Wendisch, S. Schnicke, H. Ruan, M. Farwick, D. Reinscheid und B. J. Eikmanns (2003). "Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*." J Biotechnol **104**(1-3): 99-122.
- Han, S. O., M. Inui und H. Yukawa (2008). "Effect of carbon source availability and growth phase on expression of *Corynebacterium glutamicum* genes involved in the tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass." Microbiology **154**(Pt 10): 3073-3083.

- Hanahan, D. (1985). "Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA Cloning*. Glover, D.M. (ed). Oxford, UK: IRL Press, pp. 109-135."
- Hashimoto, K., Y. Shray und M. Tanigaki (1989). "Culture method for microorganism and plant cell". **JP Patent 01,296,977 (to Kao Co., Japan)**
- Hermann, B. G., K. Blok und M. K. Patel (2007). "Producing bio-based bulk chemicals using industrial biotechnology saves energy and combats climate change." *Environ Sci Technol* **41**(22): 7915-7921.
- Hermann, B. G. und M. Patel (2007). "Today's and tomorrow's bio-based bulk chemicals from white biotechnology: a techno-economic analysis." *Appl Biochem Biotechnol* **136**(3): 361-388.
- Höner zu Bentrup, K., A. Miczak, D. L. Swenson und D. G. Russell (1999). "Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*." *J Bacteriol* **181**(23): 7161-7167.
- Hubbert, M. K. (1969). Energy Resources. *Resources and Man*. Freeman, San Francisco. P. Cloud: p. 157-242.
- Hüser, A. T., A. Becker, I. Brune, M. Dondrup, J. Kalinowski, J. Plassmeier, A. Pühler, I. Wiegräbe und A. Tauch (2003). "Development of a *Corynebacterium glutamicum* DNA microarray and validation by genome-wide expression profiling during growth with propionate as carbon source." *J Biotechnol* **106**(2-3): 269-286.
- Ikeda, M. und S. Nakagawa (2003). "The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes." *Appl Microbiol Biotechnol* **62**: 99-109.
- Inui, M., H. Kawaguchi, S. Murakami, A. A. Vertes und H. Yukawa (2004). "Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions." *J Mol Microbiol Biotechnol* **8**(4): 243-254.
- Jäger, W., A. Schäfer, A. Pühler, G. Labes und W. Wohlleben (1992). "Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*." *J Bacteriol* **174**(16): 5462-5465.
- Jaklitsch, W. M., C. P. Kubicek und M. C. Scrutton (1991). "The subcellular organisation of itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*." *J Gen Microbiol* **137**: 533-539.
- Jakubowska, J. und D. Metodiewa (1974). "Studies on the metabolic pathway for itartartaric acid formation by *Aspergillus terreus*. II. Use of citramalate, citraconate and itaconate by cell-free extracts." *Acta Microbiol. Pol. Ser. B. Microbiol. Appl.* **6**: 51-61.
- Jana, S. und J. K. Deb (2005). "Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*." *Appl Microbiol Biotechnol* **67**(3): 289-298.
- Jojima, T., M. Fujii, E. Mori, N. Inui und H. Yukawa (2010). "Engineering of sugar metabolism of *Corynebacterium glutamicum* for production of amino acid L-alanine under oxygen deprivation." *Appl Microbiol Biotechnol* **87**(1): 159-165.
- Kadokura, H., F. Katzen und J. Beckwith (2003). "Protein disulfide bond formation in prokaryotes." *Annu Rev Biochem* **72**: 111-135.
- Kalinowski, J., B. Bathe, D. Bartels, N. Bischoff, M. Bott, A. Burkowski, N. Dusch, L. Eggeling, B. J. Eikmanns, L. Gaigalat, A. Goesmann, M. Hartmann, K. Huthmacher, R. Krämer, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, B. Möckel, W. Pfefferle, A. Pühler, D. A. Rey, C. Rückert, O. Rupp, H. Sahm, V. F. Wendisch, I. Wiegräbe und A. Tauch (2003). "The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins." *J Biotechnol* **104**: 5-25.
- Kanamasa, S., L. Dwiarti, M. Okabe und E. Y. Park (2008). "Cloning and functional characterization of the *cis*-aconitic acid decarboxylase (CAD) gene from *Aspergillus terreus*." *Appl Microbiol Biotechnol* **80**(2): 223-229.
- Kane, J. F. (1995). "Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*." *Curr Opin Biotechnol* **6**(5): 494-500.

- Kapust, R. B. und D. S. Waugh (1999). "*Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused." Protein Sci **8**(8): 1668-1674.
- Kawamura, D., M. Furuhashi, O. Saito und H. Matsui (1981). Production of itaconic acid by fermentation. **JP Patent 56,137,893 (to Iwata)**
- Kin, R., T. Sai und S. So (1998). Itaconate copolymer with quadratic nonlinear optical characteristic. **JP-Patent 10 293 331**
- Kinoshita, K. (1931). "Über eine neue *Aspergillus* Art, *A. itaconicus*." Bot. MAG. Tokyo **45**: 45-50.
- Kinoshita, S., S. Uda und M. Shimono (1957). "Studies on the amino acid fermentation: I. Production of L-glutamic acid by various microorganism." J Gen Appl Microbiol **3**: 193-205.
- Kirchner, O. und A. Tauch (2003). "Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*." J Biotechnol **104**(1-3): 287-299.
- Kouwen, T. R., A. van der Goot, R. Dorenbos, T. Winter, H. Antelmann, M.C. Plaisier, W. J. Quax, J. M. van Dijk und J. Y. Dubois (2007). "Thiol-disulphide oxidoreductase modules in the low-GC Gram-positive bacteria." Mol Microbiol **64**(4): 984-999.
- Krause, F. S., B. Blombach und B. J. Eikmanns (2010). "Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for 2-ketoisovalerate production." Appl Environ Microbiol **76**(24): 8053-8061.
- Kuenz, A., Y. Gallenmüller, T. Willke und K. D. Vorlop (2012). "Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations." Appl Microbiol Biotechnol **1**: 1.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lai, S., Y. Zhang, S. Liu, Y. Liang, X. Shang, X. Chai und T. Wen (2012). "Metabolic engineering and flux analysis of *Corynebacterium glutamicum* for L-serine production." Sci China Life Sci **55**(4): 283-290.
- Lancashire, E. (1969). Soap compositions having improved curd-dispersing properties. **US Patent 3,454,500 (to Procter and Gamble)**.
- Larsen, H. und K. E. Eimhjellen (1954a). "The Mechanism of Itaconic acid Formation by *Aspergillus terreus*. 1. The effect of acidity." Biochem J **60**: 135-139.
- Larsen, H. und K. E. Eimhjellen (1954b). "The Mechanism of Itaconic acid Formation by *Aspergillus terreus*. 2. The effect of substrates and inhibitors." Biochem J **60**: 139-147.
- LaVallie, E. R., Z. Lu, E. A. Dilibasio/Smith, L. A. Collins/Racie und J. M. McCoy (2000). "Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*." Methods Enzymol **326**: 322-340.
- Levinson, W., C. Kurtzman und T. Kuo (2006). "Production of itaconic acid by *Pseudozyma antarctica* NRRL Y-7808 under nitrogen-limited growth conditions." Enzyme Microb Technol **39**: 824-827.
- Li, A., N. van Luijk, M. ter Beek, M. Caspers, P. Punt und M. van der Werf (2011). "A clone-based transcriptomics approach for the identification of genes relevant for itaconic acid production in *Aspergillus*." Fungal Genet Biol **48**(6): 602-611.
- Link, A. J., D. Phillips und G. M. Church (1997). "Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization." J Bacteriol **179**(20): 6228-6237.
- Litsanov, B., A. Kabus, M. Brocker und M. Bott (2012a). "Efficient aerobic succinate production from glucose in minimal medium with *Corynebacterium glutamicum*." Microb Biotechnol **5**(1): 116-128.
- Litsanov, B., M. Brocker und M. Bott (2012b). "Glycerol as a substrate for aerobic succinate production in minimal medium with *Corynebacterium glutamicum*." Microb Biotechnol.

- Litsanov, B., M. Brocker und M. Bott (2012c). "Toward homosuccinate fermentation: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anaerobic production of succinate from glucose and formate." Appl Environ Microbiol **78**(9): 3325-3337.
- Lockwood, L. und M. Reeves (1945). "Some factors affecting the production of itaconic acid by *Aspergillus terreus*." Arch Biochem **6**: 455-469.
- Makrides, S. C. (1996). "Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*." Microbiol Rev **60**(3): 512-538.
- McFadden, B. A. und S. Purohit (1977). "Itaconate, an isocitrate lyase-directed inhibitor in *Pseudomonas indigofera*." J Bacteriol **131**(1): 136-144.
- McKinlay, J. B., C. Vieille und J. G. Zeikus (2007). "Prospects for a bio-based succinate industry." Appl Microbiol Biotechnol **76**: 727-740.
- Mullis, K. B. und F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-350.
- Niebesch, A. und M. Bott (2001). "Molecular analysis of the cytochrome *bc₁-aa₃* branch of the *Corynebacterium glutamicum* respiratory chain containing an unusual diheme cytochrome *c₁*." Arch Microbiol **175**(4): 282-294.
- Novicky, N. N. (1981). Oxygen permeable hard and semi-hard contact lense compositions methods and articles of manufacture II. **US-Patent 4 248 989**
- Nowakowska-Waszczyk, A. (1973). "Utilization of some tricarboxylic-acid-cycle intermediates by mitochondria and growing mycelium of *Aspergillus terreus*." J. Gen. Microbiol. **79**: 19-29.
- Okabe, M., D. Lies, S. Kanamasa und E. Y. Park (2009). "Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*." Appl Microbiol Biotechnol **84**(4): 597-606.
- Peters-Wendisch, P., M. Stolz, H. Etterich, N. Kennerknecht, H. Sahm und L. Eggeling (2005). "Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-serine production." Appl Environ Microbiol **71**(11): 7139-7144.
- Pichler, H., F. Obenhaus und G. Franz (1967). "Erdöl, Kohle, Erdgas." Petrochemie **20**: 188.
- Pitzl, G. (1951). **US-Patent 2 570 478 (to Du Pont)**
- Plassmeier, J., A. Barsch, M. Persicke, K. Niehaus und J. Kalinowski (2007). "Investigation of central carbon metabolism and the 2-methylcitrate cycle in *Corynebacterium glutamicum* by metabolic profiling using gas chromatography-mass spectrometry." J Biotechnol **130**(4): 354-363.
- Pryor, K. D. und B. Leiting (1997). "High-level expression of soluble protein in *Escherichia coli* using a His₆-tag and maltose-binding-protein double-affinity fusion system." Protein Expr Purif **10**(3): 309-319.
- Reinscheid, D. J., B. J. Eikmanns und H. Sahm (1994). "Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum* and biochemical analysis of the enzyme." J Bacteriol **176**(12): 3474-3483.
- Riscaldati, E., M. Moresi, F. Federici und M. Petruccioli (2000). "Effect of pH and stirring rate on itaconate production by *Aspergillus terreus*." Journal of Biotechnology **83**: 219-230.
- Rüdiger, C. (2000). Synthesen und Untersuchungen zum Polymerisationsverhalten von Itaconsäurederivaten. University of Wuppertal.
- Sachdev, D. und J. M. Chirgwin (1998). "Solubility of proteins isolated from inclusion bodies is enhanced by fusion to maltose-binding protein or thioredoxin." Protein Expr Purif **12**(1): 122-132.
- Sachdev, D. und J. M. Chirgwin (1999). "Properties of soluble fusions between mammalian aspartic proteinases and bacterial maltose-binding protein." J Protein Chem **18**(1): 127-136.

- Sahm, H. und L. Eggeling (1999). "D-Pantothenate synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and use of *panBC* and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction." Appl Environ Microbiol **65**(5): 1973-1979.
- Salinas, G., L. Pellizza, M. Margenat, M. Flo und C. Fernandez (2011). "Tuned *Escherichia coli* as a host for the expression of disulfide-rich proteins." Biotechnol J **6**(6): 686-699.
- Sambrook, J., P. MacCallum und D. Russell (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato, Y. und K. Inaba (2012). "Disulfide bond formation network in the three biological kingdoms, bacteria, fungi and mammals." FEBS J **279**(13): 2262-2271.
- Sauer, M., D. Porro, D. Mattanovich und P. Branduardi (2008). "Microbial production of organic acids: expanding the markets." Trends Biotechnol **26**(2): 100-108.
- Schäfer, A., A. Tauch, W. Jäger, J. Kalinowski, G. Thierbach und A. Pühler (1994). "Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*." Gene **145**: 69-73.
- Schneider, J., D. Eberhardt und V. Wendisch (2012). "Improving putrescine production by *Corynebacterium glutamicum* by fine-tuning ornithine transcarbamoylase activity using a plasmid addiction system." Appl Microbiol Biotechnol **95**(1): 169-178.
- Schneider, J. und V. F. Wendisch (2010). "Putrescine production by engineered *Corynebacterium glutamicum*." Appl Microbiol Biotechnol **88**(4): 859-868.
- Sen, M. und A. Yakar (2001). "Controlled release of antifungal drug terbinafine hydrochloride from poly(N-vinyl 2-pyrrolidone/itaconic acid) hydrogels." Int J Pharm **228**: 33-41.
- Shekawat, D., J. E. Jackson und D. J. Miller (2006). "Process model and economic analysis of itaconic acid production from dimethyl succinate and formaldehyde." Bioresource Technology **97**: 342-347.
- Shimi, I. R. und M. S. Nour El Dein (1962). "Biosynthesis of itaconic acid by *Aspergillus terreus*." Archiv für Mikrobiologie **44**: 181-188.
- Shu, C. H. und C. C. Liao (2002). "Optimization of L-phenylalanine production of *Corynebacterium glutamicum* under product feedback inhibition by elevated oxygen transfer rate." Biotechnol Bioeng **77**(2): 131-141.
- Silberbach, M., M. Schäfer, A. Hüser, J. Kalinowski, A. Pühler, R. Krämer und A. Burkovski (2005a). "Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to ammonium limitation: a global analysis using transcriptome and proteome techniques." Appl Environ Microbiol **71**(5): 2391-2402.
- Silberbach, M., A. Hüser, J. Kalinowski, A. Pühler, B. Walter, R. Krämer und A. Burkovski (2005b). "DNA microarray analysis of the nitrogen starvation response of *Corynebacterium glutamicum*." J Biotechnol **119**(4): 357-367.
- Smith, D. B. und K. S. Johnson (1988). "Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase." Gene **67**(1): 31-40.
- Smith, J. E., A. Nowakowska-Waszcuk und J. G. Andersen (1974). Organic acid production by mycelial fungi. In: Spencer B (ed) Industrial aspects of biochemistry. Elsevier, Amsterdam, pp 297-317.
- Smith, K. M., K. M. Cho und J. C. Liao (2010). "Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production." Appl Microbiol Biotechnol **87**(3): 1045-1055.
- Stäbler, N., T. Oikawa, M. Bott und L. Eggeling (2011). "*Corynebacterium glutamicum* as a host for synthesis and export of D-Amino Acids." J Bacteriol **193**(7): 1702-1709.

- Stanojevic, M., M. K. Krusic, J. Filipovic, J. Parojci und M. Stupar (2006). "An investigation into the influence of hydrogel composition on swelling behaviour and drug release from poly(acrylamide-co-itaconic acid) hydrogels in various media." Informa Pharm Sci **13**: 1-7.
- Sun, P., J. E. Tropea und D. S. Waugh (2011). "Enhancing the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli* by using hexahistidine-tagged maltose-binding protein as a fusion partner." Methods Mol Biol **705**: 259-274.
- Tabuchi, T. (1981). "Itaconic Acid production by a yeast belonging to the group *Candida*." Agric Biol Chem **45**: 475-479.
- Tabuchi, T. und T. Nakahara (1980). Preparation of itaconic acid. **JP Patent 55 034 017 (to Mitsubishi)**
- Takahashi, C., J. Shirakawa, T. Tsuchidate, N. Okai, K. Hatada, H. Nakayama, T. Tateno, C. Ogino und A. Kondo (2012). "Robust production of gamma-amino butyric acid using recombinant *Corynebacterium glutamicum* expressing glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*." Enzyme Microb Technol **51**(3): 171-176.
- Tasdelen, B., N. Kayaman-Apohan, O. Güven und B. M. Baysal (2004). "Preparation of poly(N-isopropylacrylamide/itaconic acid)copolymeric hydrogels and their drug release behaviour." Int J Pharm **278**: 343-351.
- Tate, B. (1970). "Itaconic acid, itaconic esters, and related compounds." High Polymers **24**: 205-261.
- Tate, B. (1981). "Itaconic acid and derivatives." In: Grayson M Eckroth E (eds) Kirk-Othmer Encycl Chem Technol **3**: 865-873.
- Terpe, K. (2003). "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." Appl Microbiol Biotechnol **60**(5): 523-533.
- van der Rest, M. E., C. Lange und D. Molenaar (1999). "A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA." Appl Microbiol Biotechnol **52**(4): 541-545.
- Van Ooyen, J., S. Niack, M. Bott, A. Reth und L. Eggeling (2012). "Improved L-lysine production with *Corynebacterium glutamicum* and systemic insight into citrate synthase flux and activity." Biotechnology and Bioengineering **109**: 2070-2081.
- Villela Filho, M., C. Araujo, A. Bonfa und W. Porto (2011). "Chemistry based on renewable raw materials: perspectives for a sugar cane-based biorefinery." Enzyme Res **2011**: 654596.
- Walinsky, S. W. (1984). Acrylic acid/itaconic acid copolymers their preparation and use as antiscalants. **US-Patent 4 485 223 (to Pfizer): (Meth)**
- Walls, D. und S. T. Loughran (2011). "Tagging recombinant proteins to enhance solubility and aid purification." Methods Mol Biol **681**: 151-175.
- Werpy, T. und G. Petersen (2004). Top Value Added Chemicals From Biomass. Pacific Northwest National Laboratory, USA.
- Wieschalka, S., B. Blombach und B. J. Eikmanns (2012a). "Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of pyruvate." Appl Microbiol Biotechnol **94**(2): 449-459.
- Wieschalka, S., B. Blombach, M. Bott und B. J. Eikmanns (2012b). „Bio-based production of organic acids with *Corynebacterium glutamicum*." Microb Biotechnol
- Willke, T. und K. D. Vorlop (2001). "Biotechnological production of itaconic acid." Appl Microbiol Biotechnol **56**(3-4): 289-295.
- Winskill, N. (1983). "Tricarboxylic-acid-cycle activity in relation to itaconic acid biosynthesis by *Aspergillus terreus*." J Gen Microbiol **129**: 2877-2883.

Yahiro, K., T. Takahama, Y. Park und M. Okabe (1995). "Breeding of *Aspergillus terreus* mutant TN-484 for itaconic acid production with high yield." J Ferm Bioeng **79**: 506-508.

Yahiro, K., T. Takahama, Y. Park und M. Okabe (1997). "Comparison of air-lift and stirred tank reactors for itaconic acid production by *Aspergillus terreus*." Biotechnol Lett **19**: 619-621.

Yukawa, H., C. A. Omumasaba, H. Nonaka, P. Kós, N. Okai, N. Suzuki, M. Suda, Y. Tsuge, J. Watanabe, Y. Ikeda, A. A. Vertès und M. Inui (2007). "Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R." Microbiology **152**: 1042-1058.

Zagar, J. und C. J. Campbell (2005) (presentation). The iron grip of depletion. American Meteorological Society Energy Briefing. Washington DC.

VIII Anhang

1 Gensequenz des für *C. glutamicum* Codon-Usage optimierten *cad*-Gens

ATGACCAAGCAGTCCGCAGATTCCAACGCAAAGTCCGGTGTGACCTCCGAAATCTGCCACTGGGCATCCAACCTGGCAACC
 GATGATATCCCATCCGATGTGCTGGAACGCGCAAAGTACCTGATCCTGGATGGCATCGCATGCGCATGGGTTGGCGCACG
 CGTGCCATGGTCCGAAAAAGTACGTGCAGGCAACCATGTCCTTGAACACCAGGCGCATGCCGTGTTATCGGCTACGGC
 CAGAAGCTGGGTCCAGTCGCAGCAGCAATGACCAACTCCGATTATCCAGGCAACCGAACTGGATGATTACCACTCCGA
 AGCACCCTGCACTCCGCATCCATCGTGTGCCAGCAGTGTTGCAGCATCCGAAGTGCTGGCAGAACAGGGCAAGACCA
 TCTCCGGCATCGATGTGATCCTGGCAGCAATCGTGGGCTTGAATCCGGTCCACGCATCGGCAAGGCAATCTACGGCTCC
 GATCTGTGAACAACGGCTGGCACTGCGGTGCAGTTTACGGTGCACAGCAGGCGCACTGGCAACCGGCAAGCTGCTGG
 GCCTGACCCAGATTCCATGGAAGATGCACTGGGCATCGCTGCACCCAGGCATGCGGTCTGATGTCCGCACAGTACGGT
 GGCATGGTGAAGCGCGTGCAGCACGGCTTCGCAGCACGCAACGGCCTGCTGGGTGGCCTGCTGGCAGCAGGTGGCTACG
 AAGCAATGAAGGGCGTGCTCGAACGCTCTACGGTGGCTTCTGAAGATGTTACCAAGGGCAACGGTCGGAACACCA
 TACAAGGAAGAAGAAGTCGTGCGAGGCTGGGCTCCTTCTGGCACACCTTACCATCCGCATCAAGCTGTACGCATGTGCG
 GGCTGTTTACGGTCCAGTGGAAGCAATCGAAAACCTCCAGGGTCGCTACCCAGAACTGCTGAACCGTGCAACCTGTC
 CAACATCCGCCACGTTACGTGCAGCTGTCCACCGCATCAACTCCCACTGCGGCTGGATTCCAGAAGAACGCCAATCTC
 CTCCATCGCAGGCCAGATGTCCGTGGCATACTCTGGCAGTGCAGCTGGTCGATCAGCAGTGCCTGCTGCCAGTTCTC
 CGAGTTCGATGATAACCTGGAACGCCAGAAAGTGTGGGATCTGGCCGCAAGGTGACCTCCTCCAGTCCGAAGAGTTTC
 GATCAGGATGGCAACTGCCTGTCCGCAGGTGCGGTTGCATCGAGTTCAACGATGGCTCCTCCATCACCGAATCCGTGGAA
 AAGCCACTGGGCGTGAAGGAACCAATGCCAAACGAACGCATCTGCACAAGTACCGCACCTGGCAGGCTCCGTGACCGA
 TGAATCCCGTGTGAAGGAAATCGAAGATCTGGTCTGGGCTGGATCGCTGACCGATATCTCCCACTGCTGGAACTG
 CTCAACTGCCAGTGAAGTCCCCACTGGGTGTA

2 Suche nach Homologen der *cis*-Aconitat-Decarboxylase (CAD)

Tab. 18: Suche nach Homologen der *cis*-Aconitat-Decarboxylase (CAD) aus *A. terreus*. Angegeben sind Proteine mit einer Sequenzidentität von 30% bis 100%.

Organismus	Gen-Name/ ORF	Proteinbeschreibung/ Annotation	Sequenz- Identität (%)
<i>A. terreus</i>	<i>cad1</i>	<i>cis</i> -Aconitat-Decarboxylase	100
<i>A. oryzae</i>	AO090010000161	uncharakterisiertes Protein	53
<i>A. flavus</i>	AFLA_117340	putatives Immun-responsive Protein	53
<i>A. niger</i>	An09g06220	putatives Protein	50
<i>A. kawachii</i>	AKAW_06319	putatives Protein	50
<i>A. terreus</i>	ATEG_08909	putatives Protein	46
<i>H. atrovirdis</i>	TRIATDRAFT_90183	putatives Protein	45

Organismus	Gen-Name/ ORF	Proteinbeschreibung/ Annotation	Sequenz- Identität (%)
<i>G. zeae</i>	FG11140.1	uncharakterisiertes Protein	44
<i>H. virens</i>	TRIVIDRAFT_66197	putatives Protein	44
<i>A. niger</i>	An01g09950	putatives Protein	43
<i>F. oxysporum</i>	FOX_B_08404	uncharakterisiertes Protein	43
<i>A. kawachii</i>	AKAW_00175	Immun-Responsive-Element	43
<i>A. kawachii</i>	AKAW_10658	Immun-Responsive-Element	42
<i>T. stipitatus</i>	TSTA_072830	putatives Immun-Responsive- Element	42
<i>S. stipites</i>	YXE1 PICST_43263	putatives Protein YXE1	42
<i>M. smegmatis</i>	MSMEG_6856	MmgE/PrpD-Family Protein	40
<i>N. bacterium</i>	NBCG_01094	MmgE/PrpD-Family Protein	40
<i>M. paratuberculosis</i>	MAP_2253	putatives Protein	39
<i>M. avium</i>	MAPs_15060	uncharakterisiertes Protein/ putativ Propionatmetabolismus	39
<i>M. avium</i>	MAV_1742	MmgE/PrpD-Family Protein	39
<i>S. arenicola</i>	Sare_4958	MmgE/PrpD-Family Protein	39
<i>S. tropica</i>	Strop_4443	MmgE/PrpD-Family Protein	39
<i>S. roseum</i>	Sros_6625	MmgE/PrpD-Family Protein	31
<i>A. arsenitoxydans</i>	KYC_02029	MmgE/PrpD-Family Protein	30
<i>S. chlorophenolicum</i>	Sphch_4055	MmgE/PrpD-Family Protein	30
<i>M. australicum</i>	MesauDRAFT_1386	MmgE/PrpD-Family Protein	30
<i>X. autotrophicus</i>	Xaut_1347	MmgE/PrpD-Family Protein	30
<i>C. necator</i>	prpD4 H16_B1444	2-Methylcitrat-Dehydratase	30

Bei dem Sequenzvergleich zeigte sich, dass das zum CAD-Protein am nächsten verwandte Protein nur eine Sequenzidentität von 53% aufwies. Für die Überproduktion in *C. glutamicum* wurde das Homolog aus *Mycobacterium smegmatis* gewählt (gelb markiert), weil es mit 40% eine akzeptable Sequenzidentität zur CAD aufweist und aus einem zu *C. glutamicum* verwandten Organismus stammt.

Abbildung 20: Vergleich der Codon-Usage des nativen *cad*-Gens mit der relativen Nutzung der Codons in *C. glutamicum*. Beispielhaft ist die Codon-Adaptierung für die ersten 50 Codons des *cad*-Gens aufgeführt. Die Analyse wurde mit dem „graphical codon usage analyser 2.0“ durchgeführt (<http://gcua.schoedl.de>).

Die Analyse hat gezeigt, dass 11 der 490 nativen Codons des *cad*-Gens bei der Expression in *A. terreus* als seltene Codons angesehen werden können. Diese werden mit einer relativen Häufigkeit von weniger als 20% in diesem Organismus verwendet. An diesen Stellen könnte es bei der Translation zu einer Verlangsamung bei der Proteinbiosynthese kommen, so dass das Protein korrekt gefaltet werden kann. Wenn die native Gen-Sequenz auch für *C. glutamicum* verwendet wird, kommen an 28 Positionen seltene Codons vor, wobei darunter auch 7 der 11 Codons sind, die auch in *A. terreus* als selten angesehen werden.

Danksagung

Ein ganz herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Michael Bott für die Vergabe des spannenden Themas, seinem fortlaufenden Interesse an diesem Projekt sowie der kritischen Durchsicht dieser Arbeit.

Prof. Dr. Vlada Urlacher danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein ganz besonderer Dank gilt zudem Dr. Melanie Bocker für die herzliche Betreuung und Unterstützung während meiner Doktorarbeit und für die Durchsicht dieser Arbeit.

Bei allen Mitgliedern des BioProChemBB-Projektes möchte ich mich für die kreative und freundschaftliche Atmosphäre bedanken. Die halbjährlichen Treffen waren spannend und lehrreich.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, Abi, Andrea, Boris, Brita, Christian, Doris, Ela, Graziella, Han-Min, Laura, Meike, Michael, Nurije, Sabine, Simon, Steffi, Tina, Tomo, Uli und Xenia möchte ich mich für die schöne gemeinsame Zeit bedanken. Besonderer Dank gilt hier meinen Bürokollegen Andrea, Ela, Ines, Tina, und Xenia mit denen fachliche und fachfremde Diskussionen aus allen Themengebieten immer ein Erlebnis waren.

Ein besonderer Dank gilt zudem allen Teilnehmern der Kaffeepausenrunde, Andi, Imke, Jan, Jenni, Markus, Michael, Uli und Nadine. Die Pausen mit euch waren einzigartig.

Darüber hinaus danke ich allen Institutsangehörigen des IBG-1 für die nette Atmosphäre und stete Bereitschaft zur Unterstützung.

Allen Team-Mitgliedern unseres BioTech-Fußball-Teams danke ich für drei tolle Saisons bei der Kleinfeldrunde.

Annemarie, Markus, Silke, Solvej, Sven und Totti danke ich für die außerordentlich lustige und inspirierende Zeit im Studium.

Meiner Patentante Christa möchte ich dafür danken, dass sie mich bis zum heutigen Tag begleitet hat und immer Interesse an meinem Werdegang zeigte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen wunderbaren Eltern für die liebevolle und immerwährende Unterstützung. Ohne sie wäre es mir nicht möglich gewesen meinen Weg zu gehen und den heutigen Tag so feiern zu können.

Meiner wundervollen Nadine danke ich von ganzem Herzen für ihre Liebe, ihre Geduld und ihr Verständnis, ihre unermüdliche Lebensfreude, ihre Fähigkeit mich jeden Tag zum Lachen zu bringen und dafür, dass es sie gibt.

Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Zitate wurden kenntlich gemacht.

Andreas Otten

Band / Volume 51

**Transcriptional responses and transcriptional regulators
of *Gluconobacter oxydans* 621H**

S. K. Schweikert (2012), XVI, 140 pp.

ISBN: 978-3-89336-780-1

Band / Volume 52

**Characterization of the human mu opioid receptor:
Structural and functional studies of a G protein-coupled receptor**

Y. Ma (2012), 129 pp.

ISBN: 978-3-89336-767-2

Band / Volume 53

**Optimierung der Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana*
für die enantio-selektive Synthese von (R)-Cyanhydrinen**

Entwicklung und Etablierung geeigneter Reaktionsparameter und molekulare
Stabilisierung durch rationales Enzymdesign

D. Okrob (2012), XV, 135 pp.

ISBN: 978-3-89336-782-5

Band / Volume 54

**Eine kritische Evaluierung FRET-basierter Biosensoren
als Werkzeuge für die quantitative Metabolitanalytik**

R. Moussa (2012), 113 pp.

ISBN: 978-3-89336-792-4

Band / Volume 55

**Development of Surface-FIDA towards a diagnostic tool
for Alzheimer's disease**

L. Wang-Dietrich (2012), VI, 103 pp.

ISBN: 978-3-89336-801-3

Band / Volume 56

**Untersuchungen zur sekretorischen Proteingewinnung industriell
relevanter Enzyme mit *Corynebacterium glutamicum***

S. Scheele (2012), vii, 127 pp.

ISBN: 978-3-89336-815-0

Band / Volume 57

**Novel insights into the energy metabolism of
Corynebacterium glutamicum by comprehensive analysis
of mutants defective in respiration or oxidative phosphorylation**

A. Koch-Körfges (2012), III, 137 pp.

ISBN: 978-3-89336-826-6

Band / Volume 58

Prozessnahe Hochdurchsatzoptimierung der heterologen Proteinproduktion in alternativen Wirtsorganismen

P. Rohe (2012), 165 pp.

ISBN: 978-3-89336-834-1

Band / Volume 59

Validation and characterisation of novel cellular ligands of membrane-associated HIV-1 Nef

E.C.Kammula (2012), 151 pp.

ISBN: 978-3-89336-839-6

Band / Volume 60

Untersuchungen zur Membranintegrität während der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *Escherichia coli*

S. Fleckenstein (2013), VI, 160 pp.

ISBN: 978-3-89336-841-9

Band / Volume 61

Characterization of Novel Amyloid- β Peptide (A β) Binding Ligands

S. Dornieden (2013), vii, 129 pp.

ISBN: 978-3-89336-844-0

Band / Volume 62

Regulatorische Aspekte der Expression und Sekretion heterologer Proteine in *Corynebacterium glutamicum*

A. R. Chattopadhyay (2013), VIII, 195 pp.

ISBN: 978-3-89336-845-7

Band / Volume 63

***Gluconobacter oxydans* strain development: Studies on central carbon metabolism and respiration**

J. Richhardt (2013), III, 181 pp.

ISBN: 978-3-89336-851-8

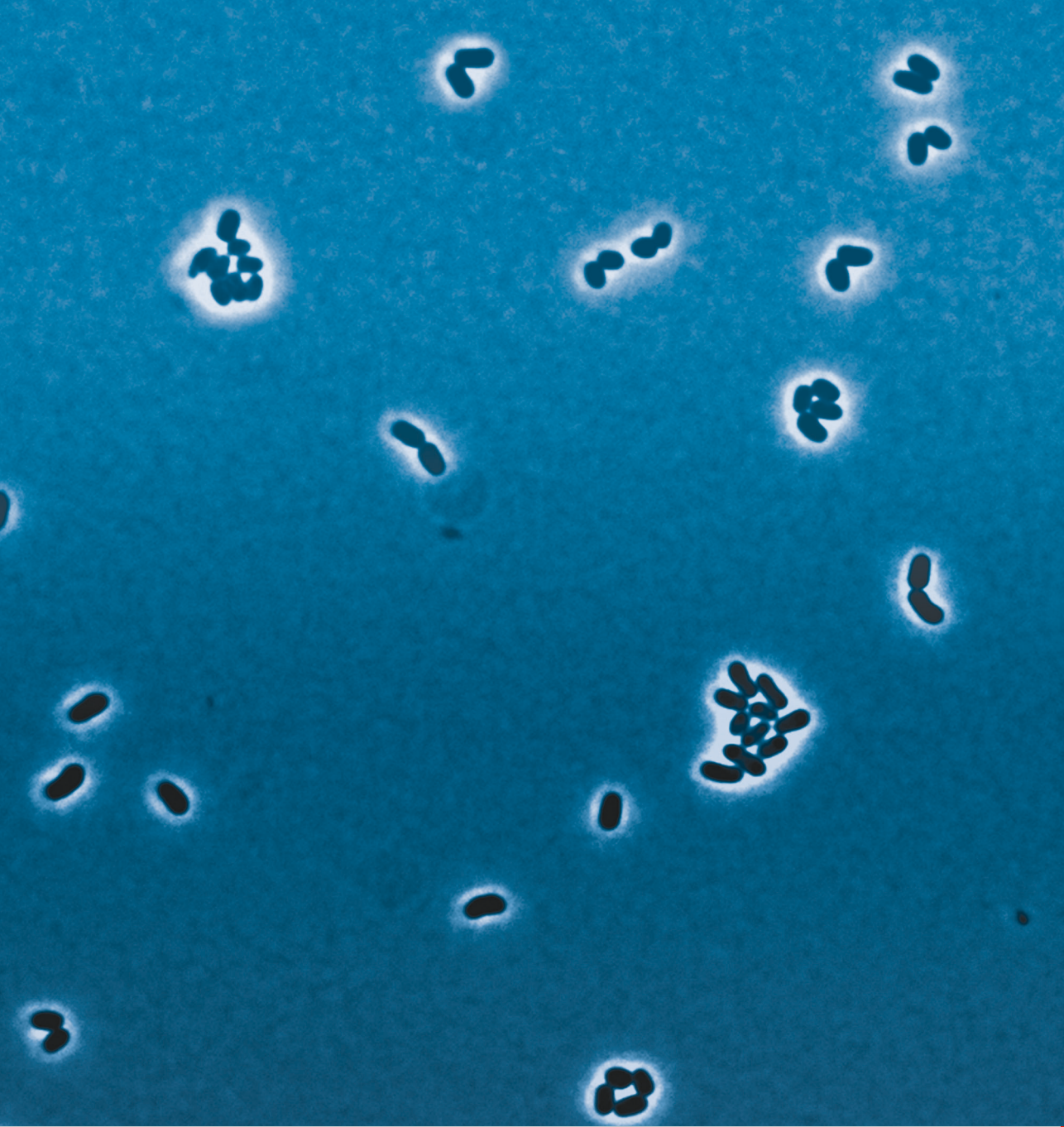
Band / Volume 64

Metabolic Engineering von *Corynebacterium glutamicum* für die Produktion einer Dicarbonsäure

A. Otten (2013), 98 pp.

ISBN: 978-3-89336-860-0

Weitere **Schriften des Verlags im Forschungszentrum Jülich** unter
<http://www.zb1.fz-juelich.de/verlagextern1/index.asp>



Gesundheit / Health
Band / Volume 64
ISBN 978-3-89336-860-0

 **JÜLICH**
FORSCHUNGSZENTRUM